



Cellules souches et revascularisation post-ischémique : mobilisation, recrutement et perspectives thérapeutiques

Adèle Richart

► To cite this version:

Adèle Richart. Cellules souches et revascularisation post-ischémique : mobilisation, recrutement et perspectives thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. <NNT : 2013PA05S014>. <tel-00919394>

HAL Id: tel-00919394

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00919394>

Submitted on 16 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole doctorale
Biologie et biotechnologie (B2T)
Spécialité : Biologie et pharmacologie de l'hémostase et des vaisseaux

Thèse présentée et soutenue publiquement par

Adèle Richart

Le 16 octobre 2013

Pour l'obtention du diplôme de
Docteur de l'Université Paris Descartes

**Cellules Souches et Revascularisation Post-ischémique:
Mobilisation, Recrutement et Perspectives Thérapeutiques**

Thèse dirigée par
Dr Jean-Sébastien Silvestre

Jury

Pr Bernard Lévy
Dr Ebba Brakenhielm
Dr Florian Sennlaub
Dr Fernando Aranzana-Seisdedos
Dr Michel Pucéat

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse: le Docteur **Ebba Brakenhielm** et le Docteur **Florian Sennlaub** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et avoir pris le temps de lire et d'évaluer mon manuscrit. Les Docteurs **Fernando Aranzana-Seisdedos** et **Michel Pucéat** pour leur participation en qualité d'examineur à mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur **Bernard Lévy** pour avoir accepté d'être le président de mon jury. Je suis très flattée car vous aurez ainsi clôturé et initié ma thèse: rappelons tout de même que vous m'avez plus ou moins imposé à Jean-Sé en M2 ! Je vous en serai toujours très reconnaissante (Jean-Sé peut-être moins). Vous avez été mon premier contact avec le monde de la recherche et une référence pour moi tout au long de ma thèse. Votre gentillesse, votre disponibilité ainsi que vos histoires surprenantes m'ont toujours impressionnées. Pour tout cela, je vous exprime toute ma gratitude.

Je remercie également le Docteur **Alain Tedgui**, notre cher directeur du PARCC, grâce à qui nous travaillons chaque jour dans un cadre particulièrement agréable et scientifiquement très riche. Merci également pour votre accessibilité, votre soutien apporté lors des congrès et votre aide pour ma recherche de postdocs.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Docteur **Jean-Sébastien Silvestre** (dit « Ze Boss »), pour m'avoir permis de continuer à croire que le monde n'est fait que de papillons et qu'une thèse peut bien se dérouler! Au-delà du fait que tes photos affichées au dessus de nos bureaux nous procurent chaque jour une joie indescriptible (tu imagines bien que j'ai rescotché celle ce que j'avais déchiré pour l'agrandir et l'afficher dans ma chambre), il faut reconnaître que tu nous permets d'évoluer dans un cadre particulièrement agréable et très formateur. Sincèrement, merci d'avoir pris le temps de me préparer à tous mes oraux, d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions scientifiques et doutes sur l'avenir, de m'avoir laissé travailler en toute confiance, de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès français et internationaux ; bref, merci de m'avoir si bien formée pendant ces 5 années au laboratoire. Sache que, malgré ma difficulté à réussir à t'appeler « mon chef adoré », je suis pleinement consciente de la chance que j'ai d'avoir pu faire ma thèse au sein de ton équipe. Merci également pour tous les bons moments passés en dehors du labo: te voir danser sur du Claude François et t'entendre chanter du Natasha StPierre à tue-tête a complètement changé ma vision de la recherche française...

Je remercie également tous les membres de l'équipe et en particulier notre irremplaçable ingénieur **José Vilar**. Je ne sais toujours pas qui est Mac Giver mais grâce à toi je m'en fais une idée plus précise : serait-ce un espagnol qui a réponse à tout, une solution à chaque problème et une petite tendance à conserver tout matériel improbable? Merci José pour tout ce que tu m'as appris, tes centaines de conseils, ta patience (oui je sais, je pose beaucoup de questions !), nos heures passées à la paillasse à débattre de sujets plus ou moins scientifiques (non les végétariens ne sont pas plus faibles !) et merci pour ton soutien pendant ma période difficile.

Je remercie toutes les filles de l'équipe avec qui on réussi l'exploit de maintenir une ambiance de travail détendue 100% féminine sans trop de débordements actu people, ragots ou crêpage de chignons. Merci donc à la merveilleuse Kiave, fantastique **Ivana**, extraordinaire **Marie**, somptueuse **Ada** et scintillante **Wineke** !! Bon courage Ivana pour ta thèse, tu verras, tu es bien tombée ! Bon courage à Marie, Ada et Wineke pour vos postdocs et carrières scientifiques !

Merci à **Kiave**, (« mis KitKat » pour les intimes) pour ta gentillesse, ton sérieux et pour m'avoir bien souvent recadrée dans mes moments de débordement. Merci aussi d'adorer te plaindre avec moi, c'est un vrai bonheur ! Je te souhaite d'obtenir un poste digne de tes compétences et qualités, tu le mérites tellement.

Merci à ceux qui sont déjà partis et ont laissé un sacré vide :

Yasmine, notre miss Nat Med qui en a bien bavé pour décrocher ce titre mais qui nous a toujours fait profiter de son rire joyeux! Je suis sûre que tu vas exceller à Boston comme tu l'as fait en thèse, je n'ai aucun doute là dessus, bon courage ! Merci aussi pour tes fameux « les oreilles n'ont pas de murs » ou « tu donaldes le fichier » ! Sache tout de même que ce n'est pas facile de passer après toi et que je culpabilise chaque jour d'être sur ton bureau sans porter de bottes ni de robes dignes de toi ...

Clément, le seul homme qui s'en est sorti (plus ou moins) bien dans cette équipe féminine grâce à une capacité de non-écoute hors du commun ! Merci d'avoir supporté notre débit de paroles (j'englobe Alice là !), nos tisanes en congres et nos refus de nuits blanches (mes parents vont lire les remerciements donc on garde cette image là de moi). J'en profite pour te révéler un secret qui va changer ta vie : les fruits qui pourrissaient sur ton bureau ne disparaissaient pas comme par magie, non, c'est un prince qui faisait ton ménage...

Alice (également appelée Adèle), ma grande compatriote de blabla ! Merci d'avoir partagé toutes ces années de thèse avec moi et de m'avoir pris sous ton aile dès mon arrivée.

Que de supers souvenirs nous avons en congrès, soirées, à Londres, Paris (comment oublier ton « Adèle, je touche pas les pédales... » et toi par terre sous le vélib prise d'un fou rire! j'en ris encore !). Un grand merci aussi pour ton soutien sans failles et pour m'avoir recueilli quand ça n'allait pas. Tu sais que tu es devenue une véritable amie et j'espère vraiment qu'on continuera à se voir (même si tu es partie bien au dessus de ma limite tolérable de climat).

Merci aux anciens, entre autres, **Céline, Stéphane, Marine, Tristan...**

Je remercie **Micheline Duriez** pour sa gentillesse, ses nombreux conseils en histologie et pour m'avoir partagé toute son expérience du monde de la recherche.

Un grand merci à l'unique **Xavier** pour sa bonne humeur constante, ses remarques flatteuses à longueur de journée et sa grande discrétion... Tu sais que je prends un malin plaisir à t'embêter! Merci pour tes blagues toujours surprenantes, l'ambiance que tu mets dans l'équipe (oui tu es accepté dans la dream team...) et les ragots du bâtiment ! Merci pour tout. Je te souhaite d'obtenir un poste que tu mérites. Smile.

Merci également aux autres thésards du labo, **Mikael, Julie et Pauline** avec qui, il faut le reconnaître, discuter de nos craintes et de notre stress nous fait beaucoup de bien ! Nous ne sommes pas seuls! Merci à **Anne-Clémence** pour sa bonne humeur et son énergie inépuisables ! Nous avons quand même réussi à faire deux séances peignoir/sauna et peignoir/baignoire en une seule thèse et toujours dans un contexte professionnel, ce qui n'est pas rien ! Merci à **Carole** pour sa gentillesse. Et enfin grand merci à **Coralie**, notre reine de la cytométrie, pour m'avoir sauvé de nombreuses manips et avoir toujours fait preuve de beaucoup de patience et de bonne humeur dans mon apprentissage au FACS (merci aussi de supprimer de ta mémoire toutes mes conneries de manips de fin de journée).

Je tiens également à remercier tous les animaliers qui supportent au quotidien nos nombreux appels, oublis, excuses et demandes de dernière minute! Grand merci à **Elizabeth**, notre chef des souris préférée, à qui on pardonne facilement les « Non. Tu peux pas avoir tes souris aujourd'hui » quand on réalise à quel point elle se démène avec brio pour faire tourner cette énorme animalerie ! Et puis bon, en tant que demi-réunionnaise, tu es forcément géniale !

Merci à tout le personnel administratif et plus particulièrement à **Matrine Autran** de s'inquiéter (surement plus que nous) pour notre salaire et à **Annette** pour son incroyable bonne humeur. Merci à **Véro**, notre maman poule, pour avoir toléré ma constante incompétence à passer convenablement une commande pendant toutes ces années (désolée !).

Un grand merci à mes amies **Blandine**, **Camille** et **Cyrielle** d'avoir plus ou moins accepté que j'utilise ma « thèse » comme motif de (léger) retard à toutes nos soirées !

Merci à ma cousine de cœur de beurre **Charline** qui a eu l'excellente idée de venir vivre sur Paris et d'égayer mes soirées manips à coup d'actu people et idées insolites !

Merci à mon super coloc/cousin **Quentin** de me supporter au quotidien, de tolérer ma petite tigresse d'amour Ouvéa et ma poisse de tuyauterie, de savoir ce qu'est une transfection, de contenir son étonnement à chaque film/série/musique culte que je ne connais pas et de ne pas briser ma naïveté. En contre partie, je rigole à toutes tes blagues quand même !

Un énorme merci à ma meilleure amie **Tiphaine** pour avoir toujours été là et cru en moi. Merci aussi de m'offrir le plus beau des cadeaux de fin de thèse : une petite pop-crevette à chérir autant que je veux !!

Un grand merci à mon piti pwince mauwichien préféré, **Lionel**. Merci de m'avoir écouté, secoué et supporté à chacune de mes crises existentielles ! Tu as été mon rock pendant toutes ces années parisiennes et sache que tu y es pour beaucoup si je suis la seule personne que tu connaisses à ne pas déprimer en fin de thèse !

Je tiens à mentionner Pierre-Alain qui m'aura appris très subtilement à relativiser les difficultés et épreuves d'une thèse.

En fin, merci à ma famille. Mes sœurs **Elodie** et **Loïse** pour avoir toujours cru en moi et toléré mes retours de princesse à la Réunion (oui je sais, je suis la préférée des parents et de Néma pendant les 15 jours annuels où je reviens !). L'éloignement n'est pas toujours facile à vivre et je suis contente que vous ayez pu venir plusieurs fois me voir en métropole. Loïse, désolée pour l'expérimentation animale...

Mille mercis à mes parents pour leur soutien sans failles (je pense notamment au « on comprend rien à ton truc » de maman ou « tu cherches encore ? » de papa !). Merci de vous êtes intéressés de si près à ma thèse et d'avoir fait l'effort de retenir « SDF-1gamma » (bon par contre c'est « CXCL12 » en fait... hihi). Merci d'être si souvent venu m'apporter un peu

de soleil (certes imaginaire) dans ma grisaille parisienne et de m'avoir permis de venir me ressourcer à la Réunion tous les ans. Je n'aurai jamais réussi à surmonter toute cette vie parisienne et cette thèse sans vous, donc promis, un jour je l'aurai mon poste à la Réunion et on supprimera Skype de notre ordi ! Merci pour tout.

Et désolée aux souris...

INTRODUCTION.....	3
I. Ischémie tissulaire et régénération vasculaire	4
1. Les pathologies ischémiques	4
a. Epidémiologie des maladies ischémiques	4
b. Physiopathologie de l'ischémie du membre inférieur.....	5
c. Traitements actuels de l'ischémie du membre inférieur	6
• Modification des facteurs de risque.....	6
• Intervention chirurgicale.....	7
2. Les différents processus de la revascularisation post-ischémique	8
a. Vasculogénèse.....	9
b. Angiogénèse.....	10
c. Artériogénèse	11
d. Collatéralisation.....	11
3. Acteurs de la régénération vasculaire post-ischémique	12
a. Hypoxie et système HIF	12
b. Facteurs de croissance	14
• VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).....	14
• FGF (Fibroblast Growth Factor)	18
• PDGF (Platelet-Derived Growth Factor).....	19
c. NO	20
d. Forces hémodynamiques	21
e. Micro-ARNs	22
• Biogénèse des micro-ARNs.....	22
• Mécanismes d'action des micro-ARNs	23
• Micro-ARNs et pathologies ischémiques.....	24
f. Système hormonal : Angiotensine II	25
g. Inflammation.....	27
II. Mobilisation des cellules médullaires	30
1. Les différents types cellulaires mobilisés	30
a. Cellules myéloïdes	31
• Monocytes et macrophages.....	31
• Neutrophiles.....	32
• Mastocytes	33
b. Cellules lymphocytaires.....	34
• Les Lymphocytes T	34
• Lymphocytes T régulateurs (Treg)	34
• Les cellules NK (Natural Killer)	35
c. Cellules souches mésenchymateuses.....	35
d. Cellules progénitrices endothéliales	36
• CPE tissulaires et circulantes	37
• Hématopoïétiques et non-hématopoïétiques CPE	38
• CPE précoces et CPE tardives.....	39
e. Progéniteurs des cellules musculaires lisses	42
2. Mécanismes de mobilisation de la moelle vers le sang	43
a. Inhibition de la rétention : système MMP-9/ cKit/ CXCL12/ eNOS.....	43
b. CSF (Colony-Stimulating Factor).....	45
c. Système neuro-hormonal	46
• Les catécholamines : Dopamine et Norépinephrine	46
• Catécholamines et mobilisation des cellules médullaires	48

III. Recrutement des cellules médullaires.....	50
1. Attraction et activation des cellules médullaires par les chimiokines.....	50
a. Qu'est-ce qu'une chimiokine ?	50
b. Les différentes chimiokines participant au recrutement.....	52
• CCL2 (CCL2) / CCR2	52
• CX3CL1 / CXCR3	53
• CXCL9-10 / CXCR3	53
c. CXCL12 (SDF-1).....	54
• Structure moléculaire.....	54
• Mode d'action - chimiotactisme	56
• CXCL12/CXCR4 et revascularisation post-ischémique	58
d. Activation de la cellule médullaire: interaction CXCL12/CXCR4	59
2. Roulement, arrêt et transmigration des cellules dans le tissu ischémique	61
a. Roulement des cellules grâce aux sélectines	61
b. Arrêt des cellules grâce aux intégrines	62
c. Transmigration endothéliale.....	63
3. Devenir des cellules dans le tissu ischémique.....	64
a. Différenciation et intégration des cellules	65
b. Effet paracrine	66
c. Interaction avec le tissu hôte.....	68
IV. La thérapie cellulaire : nouveau traitement contre les pathologies ischémiques ?	70
1. Quelles cellules pour quel traitement ?.....	71
a. BM-MNC et PB-MNC.....	71
b. Les cellules souches mésenchymateuses	74
c. Les progéniteurs endothéliaux	76
2. Stratégies pour augmenter l'efficacité de la thérapie cellulaire	77
a. Pré-conditionnement des cellules souches adultes	77
b. Co-traitements	79
c. Mode d'administration des cellules.....	79
d. Autres types cellulaires	81
• Les iPS (Induced Pluripotent Stem Cells)	82
• Les Cellules Souches Embryonnaires (CSE)	84
RESULTATS	87
I. Article 1 : Sympathetic Nervous System Regulates Bone Marrow-Derived Cell Egress Through Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation: Role in Postischemic Tissue Remodeling.....	88
II. Article 2 : Homeostatic and Tissue Reparation Defaults in Mice Carrying Selective Genetic Invalidation of CXCL12/Proteoglycan Interactions	103
III. Article 3 : Role of miR-21 in the Proangiogenic Effect of Human Multipotent Cardiovascular Progenitors	131
DISCUSSION	172
REFERENCES	184
ANNEXES.....	206

INTRODUCTION

I. Ischémie tissulaire et régénération vasculaire

1. Les pathologies ischémiques

a. Epidémiologie des maladies ischémiques

Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2008, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde et représentent 30% des décès globaux. En France, elles tuent chaque année entre 150.000 et 180.000 personnes. Parmi les nombreuses maladies cardiovasculaires, les deux pathologies ischémiques les plus graves et fréquentes sont l'infarctus du myocarde et la maladie artérielle périphérique. Cette dernière touche à elle seule environ 3% des hommes et 2% des femmes, et concerne plus de 800.000 patients en France. Malgré les traitements existants, l'ischémie du membre inférieur reste un véritable problème de santé publique, réduisant la qualité de vie des patients et augmentant considérablement les risques d'évènements cardiovasculaires majeurs. La recherche actuelle tente ainsi d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour rétablir une vascularisation adéquate et restaurer la fonction du tissu lésé. Ce travail de thèse résume les connaissances actuelles des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent la revascularisation post-ischémique, et expose les avancées faites en matière de thérapie cellulaire.

b. Physiopathologie de l'ischémie du membre inférieur

La maladie artérielle périphérique se définit par l'occlusion totale ou partielle d'une artère située en périphérie de l'aorte, au niveau des membres inférieurs, supérieurs ou du cerveau. La principale cause de cette pathologie est l'athérosclérose qui se manifeste par l'accumulation de lipides dans l'intima des artères pouvant causer la formation d'un thrombus et obstruer la circulation sanguine ¹. Toutefois, l'ischémie du membre inférieur peut également résulter de bien d'autres facteurs comme dans le cas de la maladie de Buerger (thromboangiitidose obliterante) où la composante ethnique et le tabagisme jouent des rôles prépondérants ².

La principale manifestation clinique de la maladie artérielle périphérique est la claudication intermittente qui se définit par une douleur essentiellement localisée au niveau du mollet, ressentie pendant la marche et qui s'estompe au repos. Malheureusement pour 25% de ces patients, la sévérité des symptômes s'accroît doucement avec le temps. 10% d'entre eux finissent par présenter une ischémie critique, stade auquel ils ressentent une douleur au repos qui persiste pendant le sommeil et qui s'accompagne parfois d'ulcération ou de gangrène. Dans 5% des cas, 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, la gravité de la maladie est telle qu'une nécrose et une perte tissulaire se développent, nécessitant alors l'amputation du membre ¹.

Étant essentiellement d'origine athéromateuse, les principaux facteurs de risques de la maladie artérielle périphérique sont l'âge (au-delà de 40 ans), le tabac, le diabète, l'hyperlipidémie et l'hypertension. Du fait de ces facteurs aggravants, de leur athérosclérose systémique et de leur haut risque d'événements cardiovasculaires ischémiques, ces patients nécessitent un suivi médical pointu. Il existe d'ailleurs plusieurs traitements permettant de limiter l'évolution de la pathologie.

c. Traitements actuels de l'ischémie du membre inférieur

- **Modification des facteurs de risque**

Une des stratégies permettant de limiter l'évolution de la pathologie est la modification des facteurs de risque. L'arrêt du tabac, par exemple limite la progression de l'ischémie critique du membre inférieur et diminue les risques d'infarctus du myocarde et d'évènements vasculaires mortels ³.

Plusieurs essais cliniques ont également montré l'effet bénéfique de la diminution du taux de cholestérol chez les patients. En effet, les traiter avec des statines diminue non seulement leur cholestérolémie, mais améliore également leur fonction endothéliale et certains marqueurs de risque de l'athérosclérose comme l'inflammation ⁴. Etant des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, enzyme impliquée dans la voie de synthèse du cholestérol à partir de l'Acetyl-CoA, les statines réduisent particulièrement la production de cholestérol LDL et limitent ainsi le développement de la plaque d'athérome et donc l'occlusion vasculaire.

L'étude clinique, menée par l'Anti-platelet Trialist's Colaboration sur plus de 100.000 patients à hauts risques d'occlusion vasculaire, a également montré que les antiplaquettaires comme l'aspirine réduisent les risques d'infarctus du myocarde non fatal et d'accident vasculaire cérébral ^{5 6}. En bloquant l'agrégation plaquettaire, ces traitements limitent la formation du thrombus, et donc l'occlusion artérielle.

Des anticoagulants, pour la plupart des antagonistes de la vitamine K, sont également utilisés comme traitement médicamenteux pour prévenir des risques de thrombose. En effet, la vitamine K étant essentielle pour l'activation des protéines de la coagulation, son inhibition limite la formation du caillot sanguin.

- **Intervention chirurgicale**

Lorsque la pathologie est plus avancée et que les traitements pharmacologiques ne suffisent plus, une intervention chirurgicale devient nécessaire. Deux techniques sont principalement utilisées par les chirurgiens vasculaires : l'angioplastie per cutanée, souvent associée avec la pose d'un stent endovasculaire, et le pontage.

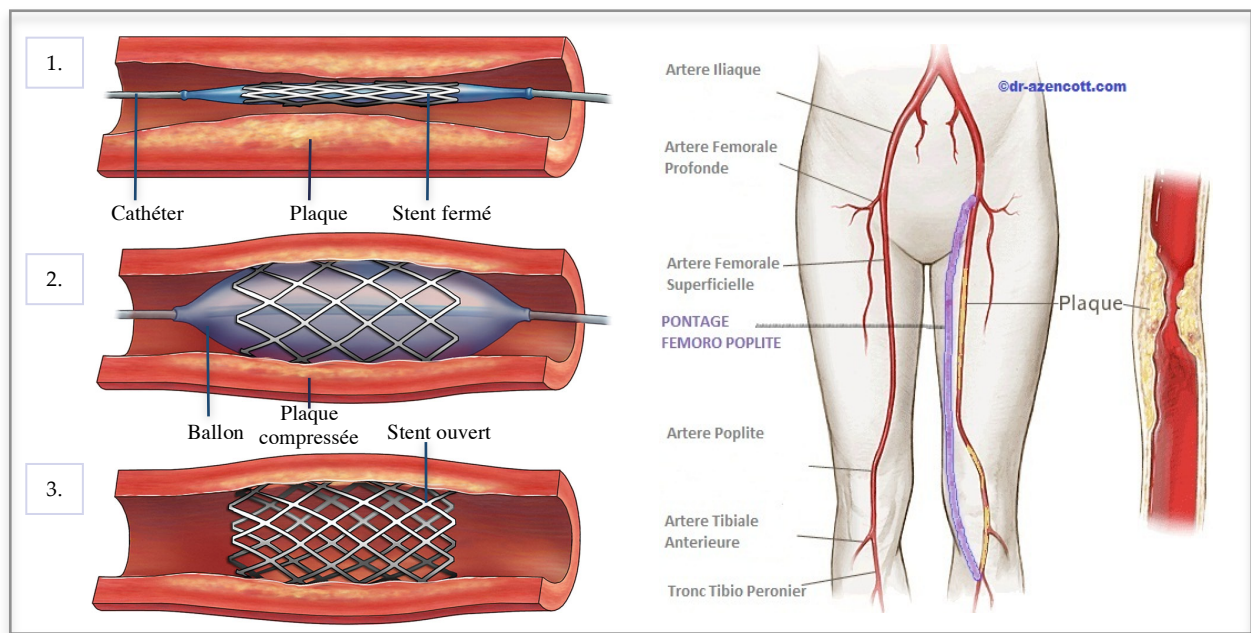


Figure 1: Angioplastie et Pontage

L'angioplastie per cutanée consiste en l'introduction par la lumière du vaisseau d'un petit ballon jusqu'au lieu de l'occlusion où il sera gonflé plusieurs fois afin d'écraser l'athérome et de dilater le vaisseau. Un stent, structure métallique maillée et tubulaire, peut ensuite être déposé en intra-luminal afin de maintenir la structure vasculaire et de limiter les risques de resténose. La pose d'un stent offre de meilleurs résultats lorsqu'il s'agit d'un vaisseau présentant une longue lésion de plus de 6cm, une occlusion totale et chronique ou des calcifications ⁷. Malheureusement, dans 30% des cas une resténose survient malgré la

présence du stent, notamment due à une prolifération cellulaire à l'intérieur du dispositif métallique. De nouveaux stents, dits « actifs », contenant une substance médicamenteuse antiproliférative telle que le nitinol sont actuellement utilisés mais restent encore à améliorer.

Le pontage consiste en l'implantation d'un nouveau vaisseau entre l'artère en amont du vaisseau lésé et la partie en aval de la sténose. Ce « pont », qui a pour but de rétablir un flux sanguin satisfaisant, se fait soit à l'aide d'une partie de la veine saphène directement prélevé sur le patient, soit avec un vaisseau synthétique. D'après l'étude SYNTAX (Synergy between percutaneous coronary intervention and cardiac surgery) cette technique chirurgicale, pourtant plus ancienne et plus lourde que l'angioplastie, présente de meilleurs résultats chez des patients porteurs de lésions stables tritronculaires et/ou du tronc commun en dehors du contexte de l'infarctus du myocarde.

Malgré les traitements pharmacologiques et chirurgicaux actuels, certains patients doivent subir une amputation. Les dommages tissulaires étant directement liés à l'étendue, l'intensité et la durée de l'ischémie, la revascularisation spontanée ou induite par des traitements a une importance cruciale. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent la revascularisation post-ischémique, ainsi que la mise au point de stratégies thérapeutiques pro-angiogéniques, représentent donc des enjeux majeurs.

2. Les différents processus de la revascularisation post-ischémique

La complexité et la variabilité des structures vasculaires résultent de l'intervention de nombreux acteurs moléculaires et cellulaires qui interagissent ensemble au cours du développement embryonnaire mais également à l'âge l'adulte. On distingue quatre grands

mécanismes qui permettent la formation et le remodelage d'un réseau vasculaire : la vasculogénèse, l'angiogénèse, l'artériogénèse et la collatéralisation.

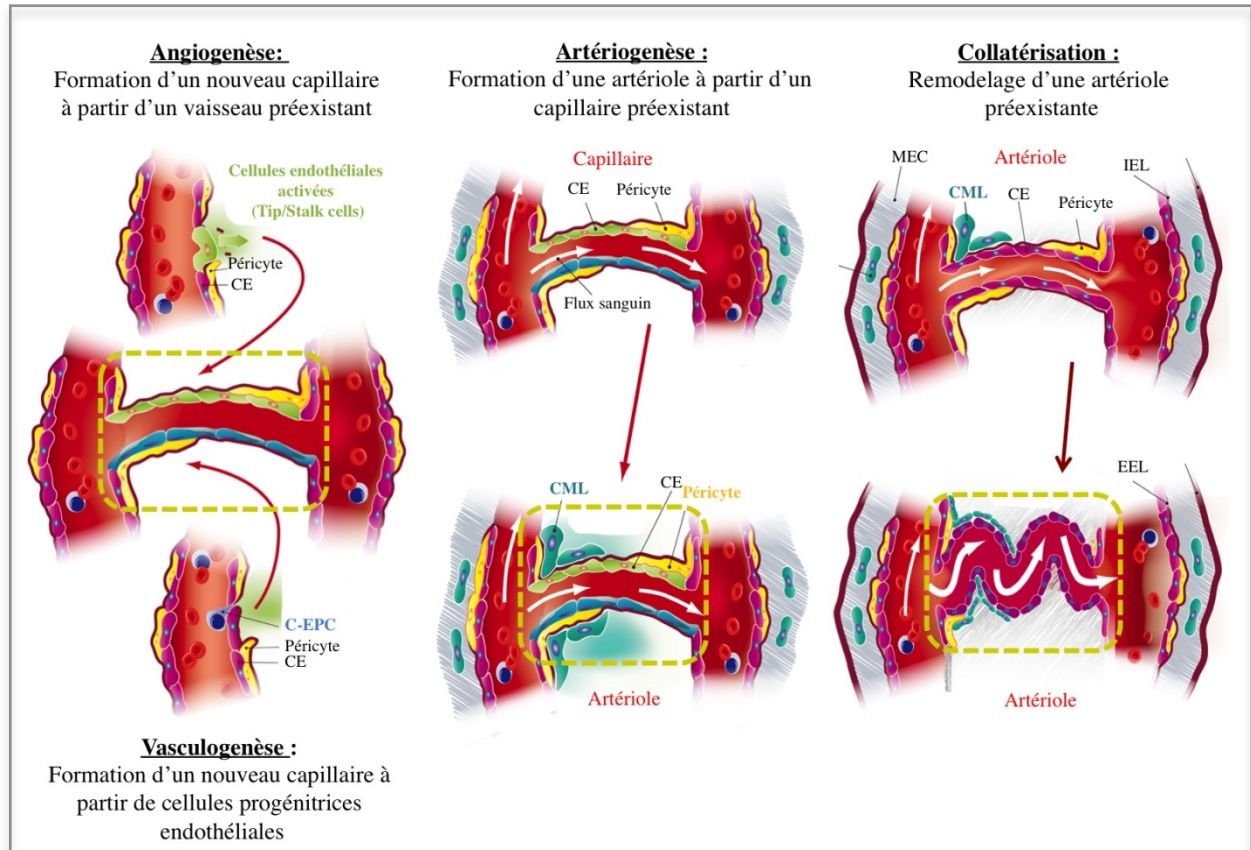


Figure 2: Mécanismes impliqués dans la revascularisation post-ischémique.

D'après JS. Silvestre, B. Lévy et D. Smadja, 2012.

a. Vasculogénèse

La vasculogénèse consiste en la formation d'un réseau vasculaire de type capillaire issu de la différenciation et de la prolifération de cellules progénitrices endothéliales. Les parois sont ensuite consolidées grâce au recrutement de progéniteurs de cellules murales.

Pendant de nombreuses années, la vasculogénèse a été décrite uniquement dans le développement embryonnaire et il était considéré que la formation de nouveaux vaisseaux à

l'âge adulte ne dépendait que de la division des cellules endothéliales matures et endogènes. Il est désormais établi que des progéniteurs endothéliaux contribuent à la revascularisation chez l'adulte dans des contextes ischémiques, malins ou inflammatoires ⁸. L'utilisation de ces cellules progénitrices endothéliales comme produit de thérapie cellulaire représente d'ailleurs un espoir considérable pour traiter les pathologies ischémiques.

b. Angiogenèse

L'angiogenèse correspond à l'extension de l'arbre vasculaire à partir de vaisseaux préexistants de type capillaire. Si ce mécanisme a lieu physiologiquement au cours du développement embryonnaire, il se produit également lors de la croissance des tumeurs malignes, de la dissémination métastatique et du développement de pathologies rétinienne. L'angiogenèse peut se faire soit par intussusception, soit par bourgeonnement.

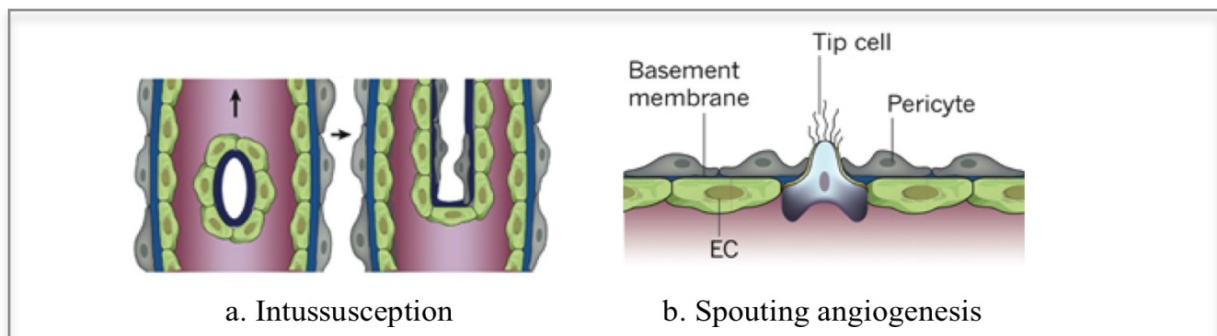


Figure 3: Initiation de l'angiogenèse par intussusception ou bourgeonnement.

D'après Carmeliet, Nature, 2011.

L'intussusception correspond à la séparation d'un capillaire en deux vaisseaux. Ce mécanisme se déroule au sein de la lumière vasculaire où les cellules endothéliales opposées face à face se mettent à établir des contacts entre elles, formant ainsi une scission

longitudinale au sein du vaisseau. Les cellules endothéliales sécrètent alors les molécules essentielles à la formation d'une matrice extra cellulaire ainsi que des cytokines qui permettent la croissance et la formation de deux nouveaux tubes vasculaires.

Le bourgeonnement se fait à partir de cellules endothéliales spécialisées, les Tip cells qui initient et guident la formation du nouveau capillaire, et les Stalk cells qui prolifèrent, migrent et constituent la nouvelle structure vasculaire.

c. Artériogenèse

L'artériogenèse correspond à la maturation de capillaires préexistants en vaisseaux de plus gros calibres comme les artérioles. Si ce processus se produit physiologiquement au cours du développement embryonnaire, on le retrouve également à l'âge adulte dans des contextes pathologiques d'hypoxie, de modification du flux sanguin ou d'inflammation. Lors de l'artériogenèse, des péricytes et des cellules musculaires lisses mûres sont recrutés, puis prolifèrent et participent ainsi à la formation de la média, puis de l'adventice du vaisseau. En plus de leur rôle structural, ces cellules synthétisent des facteurs de croissance et les différents composants de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi l'épaississement de la paroi vasculaire. Ces nouveaux vaisseaux de gros calibre se différencient ensuite selon leur localisation et leur fonction ; les propriétés contractiles des cellules musculaires lisses n'apparaissant qu'au terme de la maturation.

d. Collatérisation

La collatérisation correspond au remodelage artériel, c'est-à-dire à la modification structurale d'une artériole en réponse à un stimulus, tel qu'une perturbation du flux sanguin

ou une inflammation. Le remodelage de ces artérioles préexistantes se fait le plus souvent par une augmentation du diamètre du vaisseau et par un épaississement de la paroi. Dans la majorité des cas, ce processus se produit afin de remodeler des artérioles en véritables artères de conductance pour davantage irriguer les tissus concernés.

3. Acteurs de la régénération vasculaire post-ischémique

a. Hypoxie et système HIF

Le principal acteur de la néogenèse vasculaire est l'hypoxie tissulaire qui s'exprime par la voie de signalisation dépendante des HIFs (Hypoxia-Inductible Factors), facteurs de transcription qui modulent l'expression d'un ensemble de gènes jouant un rôle dans la revascularisation post-ischémique. Il existe deux types de HIF régulés par l'hypoxie, HIF-1 et HIF-2, qui ont une expression variable selon le type cellulaire, présentent une sensibilité à l'oxygène différente et ne ciblent pas tous les mêmes gènes⁹. HIF-1 semble être le facteur de transcription le plus dépendant de l'oxygène et le plus impliqué dans la régénération vasculaire post-ischémique. Il est composé de deux sous-unités : HIF-1 α , protéine cytoplasmique instable dans des conditions normoxiques et HIF-1 β , molécule nucléaire qui s'hétérodimérise avec HIF-1 α . En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé par les PHDs (Prolyl Hydroxylases Domain proteins) puis reconnu par la protéine pVHL (Von Hippel Lindau protein) qui va à son tour induire son ubiquitylation et donc sa dégradation par le protéosome^{10 11 12}. En condition hypoxique, l'activité des PHDs est compromise et HIF-1 α n'est plus dégradé. Stabilisé, HIF-1 α migre dans le noyau, se dimérise avec HIF-1 β puis active

l'expression de gènes cibles en se liant à leurs régions HRE (Hypoxia-Responsive Element). De façon directe ou indirecte, HIF-1 active l'expression de nombreuses molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et la eNOS (endothéliale Nitric Oxyde Synthase). HIF-1 joue également un rôle dans le recrutement des cellules progénitrices nécessaires à la vasculogenèse en activant l'expression de chimiokines telles que CXCL12. Enfin, HIF-1 contrôle la réaction inflammatoire en activant l'infiltration et l'activation des cellules myéloïdes via un mécanisme indépendant du VEGF ¹³.

De part ces multiples effets, la surexpression de HIF-1 α représente une des voies possibles de thérapie pro-angiogénique. En effet, l'injection d'adénovirus contenant HIF-1 α augmente la collatérisation du rat diabétique présentant une ischémie du membre inférieur ¹⁴. L'inhibition des PHDs, particulièrement de la PHD3, dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur améliore également la revascularisation post-ischémique en augmentant l'expression de molécules pro-angiogéniques (VEGF, eNOS, CCL2) et le recrutement des cellules inflammatoires ¹⁵.

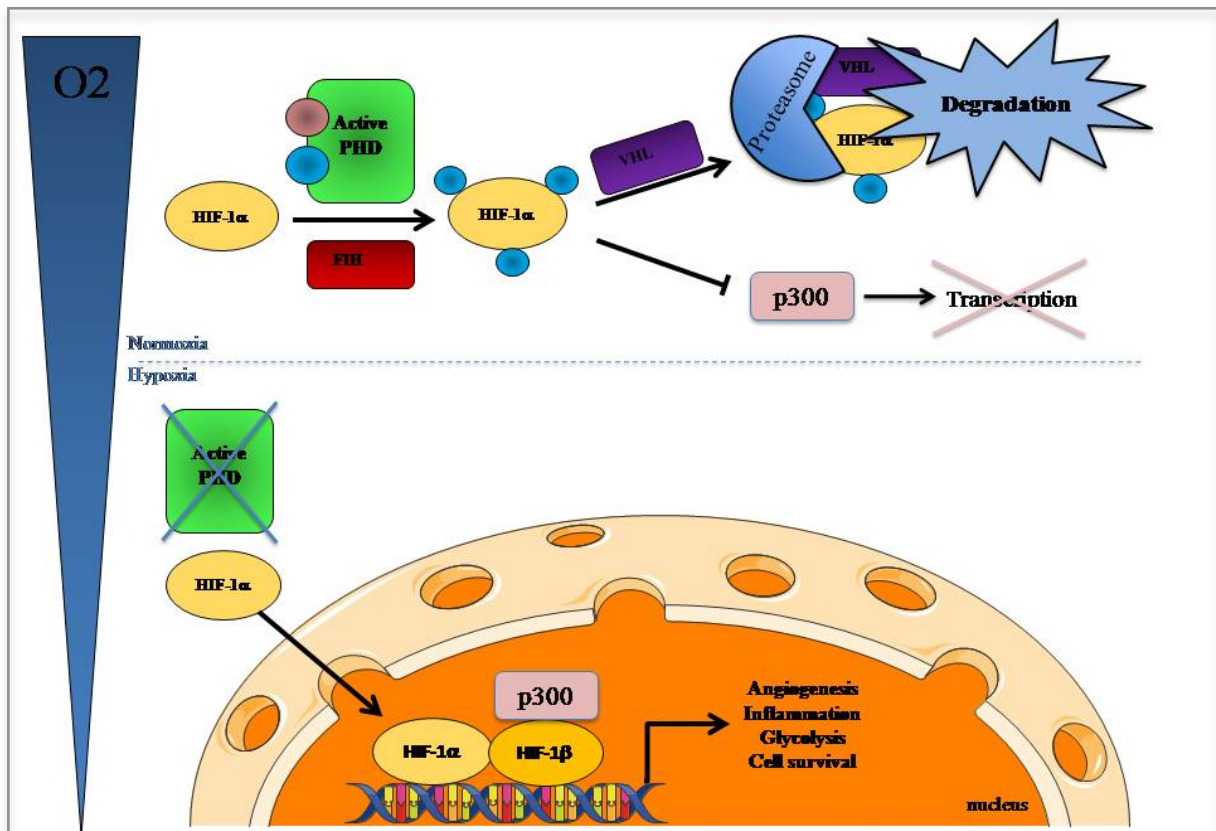


Figure 4: Activité de HIF-1α en condition normoxique ou hypoxique.

b. Facteurs de croissance

- **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**

Au regard de la complexité des processus impliqués dans la revascularisation post-ischémique, il est remarquable qu'un seul facteur de croissance, le VEGF, régule avec autant de prédominance le mécanisme. Le VEGF a d'abord été identifié comme étant un facteur de perméabilité vasculaire sécrété par les cellules tumorales ¹⁶. Depuis, le VEGF s'est révélé être un excellent activateur de la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse.

La famille des VEGFs comprend le VEGF-A, B, C, D, E, F et le PlGF (Placenta Growth Factor). Le VEGF-A, souvent simplement désigné VEGF, est le membre de la famille le plus impliqué dans la régénération vasculaire. Il a d'ailleurs été montré que l'injection intra-artérielle de VEGF-A dans un modèle d'ischémie du membre inférieur de lapin augmente à la fois la quantité d'artérioles et de capillaires, montrant ainsi l'effet du VEGF sur la collatéralisation et l'angiogenèse ^{17 18}. Il existe plusieurs isoformes de VEGF-A avec des propriétés et des actions différentes ¹⁹. En effet, les VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ ont une forte affinité pour les héparan-sulfates et sont principalement séquestrés dans la matrice extracellulaire ; le VEGF₁₂₁ est exclusivement soluble ; et le VEGF₁₆₅, la forme prédominante, existe sous forme soluble ou liée à la matrice ²⁰. Le VEGF peut se lier à trois récepteurs, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) et VEGFR-3, et à deux co-récepteurs, NRP-1 et NRP-2 (Neuropilines). L'interaction VEGF/VEGFR-3 est plutôt associée à la lymphogenèse alors que celle du VEGF au VEGFR-1 ou au VEGFR-2 active de multiples voies de signalisation impliquées dans la régénération des vaisseaux sanguins suite à une ischémie.

VEGF-A et VEGFR-2

Le rôle central du récepteur VEGFR-2 (Flk-1) dans la vasculogenèse et l'hématopoïèse a été mis en évidence grâce aux souris Flk-1^{-/-} dont les embryons meurent in utero dès les premiers jours du développement embryonnaire dû à des malformations des vaisseaux et du sang ²¹. L'équipe de Ferrara a montré que la signalisation VEGF/VEGFR-2 inhibe l'apoptose des cellules endothéliales en activant la voie PI3/Kinase AKT qui induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ²². Le VEGFR-2 est également le médiateur principal des effets mitogénique, angiogénique et perméabilisant du VEGF. En tant que co-récepteur du VEGFR-2, la neuropiline NRP-1 accentue les effets du VEGF : il a été montré

qu'elle augmentait l'interaction entre le VEGF₁₆₅ et VEGFR-2 et donc l'effet chimiotactique médié par le VEGF₁₆₅ ²³.

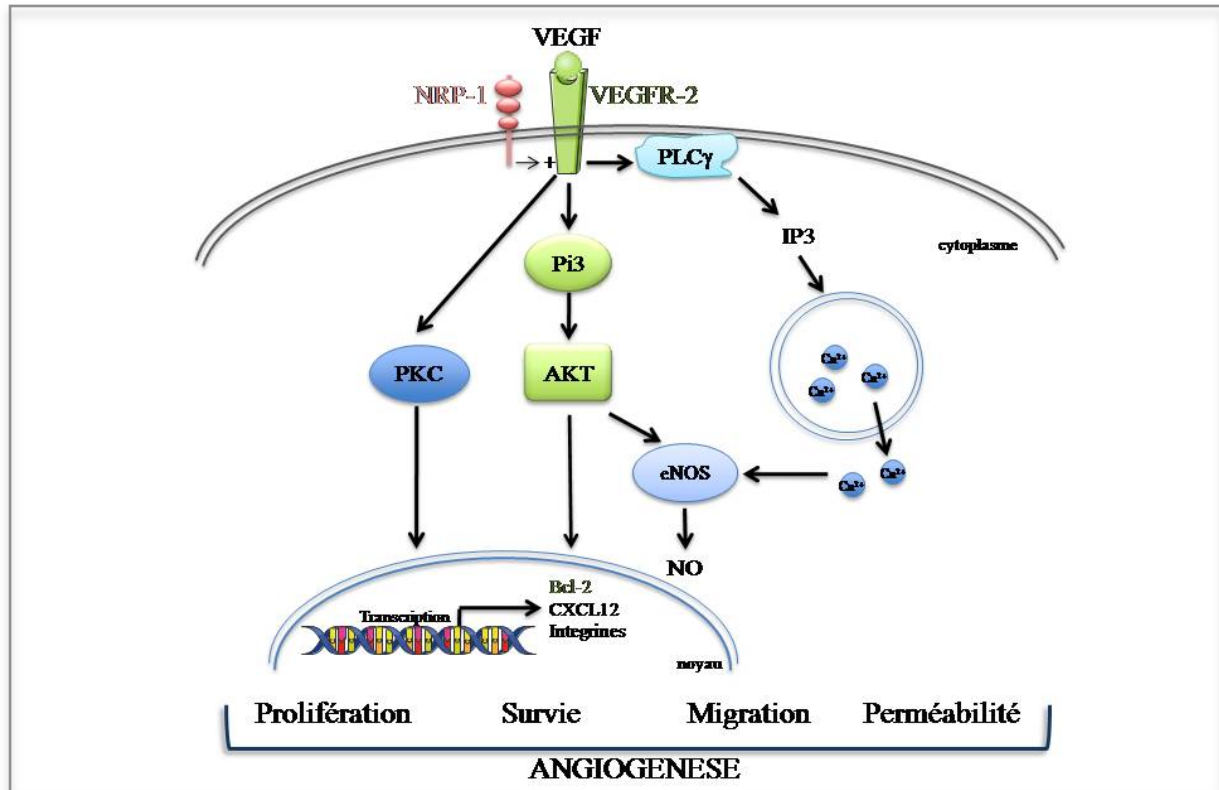


Figure 5: Voie de signalisation induite par l'interaction VEGF/VEGFR-2.

PIGF, VEGF-B et VEGFR-1

Le rôle de VEGFR-1 (Flt-1) a également été mis en évidence par la création de souris Flt-1^{-/-} dont les embryons meurent in utero dès les premiers jours du développement embryonnaire. Cependant, cette létalité serait due à une prolifération excessive des angioblastes, montrant ainsi que, au moins pendant le développement embryonnaire, le VEGFR-1 aurait un rôle de régulation négative du VEGF ²⁴. Il a été proposé que, du fait de sa faible réponse au VEGF-A, le VEGFR-1 serait un récepteur leurre qui séquestre le VEGF-A et limite l'effet induit par l'interaction VEGF-A/VEGFR-2.

Toutefois, activé par le PlGF ou le VEGF-B, le VEGFR-1 semble favoriser la revascularisation post-ischémique. Les souris invalidées pour le PlGF ($Pgf^{-/-}$) ont un développement normal mais présentent un défaut d'angiogenèse et de collatéralisation dans des contextes pathologiques comme l'ischémie. La transplantation de moelle osseuse normale dans ces souris $Pgf^{-/-}$ étant suffisante pour restaurer leurs capacités de revascularisation post-ischémique, il semble que le PlGF joue un rôle dans la mobilisation des cellules médullaires, essentielles pour la croissance vasculaire (cf chapitre II) ²⁵. De plus, il a été montré que le PlGF, via VEGFR-1, amplifiait l'effet pro-angiogénique de VEGF-A en induisant la phosphorylation de VEGFR-2 et donc sa signalisation intracellulaire ²⁶.

L'interaction VEGF-B/VEGFR-1 active également la revascularisation post-ischémique. En effet, l'administration intramusculaire de plasmides contenant du VEGF-B dans des souris ayant une ischémie du membre inférieur améliore la reperfusion de la patte ischémique, et cet effet est aboli lorsque qu'un anticorps anti-VEGFR-1 est simultanément injecté ²⁷. Cependant, le mode d'action du VEGF-B reste encore mal défini. En effet, certaines études montrent que le VEGF-B a un effet direct sur l'angiogenèse en stimulant la croissance et la migration des cellules endothéliales, alors que d'autres soutiennent l'idée qu'il participe essentiellement à la survie des cellules du vaisseau néoformé ^{28 29}.

Si les effets pro-angiogéniques du VEGF-A chez l'animal sont bien déterminés, les essais cliniques de phase II/III lancés chez l'homme afin de traiter diverses pathologies ischémiques (artériopathies des membres inférieurs, maladie artérielle périphérique, maladie de Buerger) à l'aide du VEGF-A sont très décevants. Aucun résultat positif n'a été obtenu suite à l'injection en intramusculaire d'adénovirus ou de plasmides contenant du VEGF₁₂₁ ou VEGF₁₆₅ (essais RAVE et GRONINGEN). Seule une étude en phase II (VEGF PVD) a montré un effet positif

de l'injection d'une forte dose de VEGF₁₆₅ à l'aide d'un adénovirus sur une petite cohorte de patients atteints de maladie vasculaire périphérique.

- **FGF (Fibroblast Growth Factor)**

Les FGFs sont des facteurs pléiotropiques qui peuvent stimuler différents types cellulaires dont les cellules endothéliales. Cette famille se compose de 22 membres dont le FGF-1 (acide, FGFa) et le FGF-2 (basique, FGFb) qui sont les plus étudiés dans la régénération vasculaire. Les FGFs activent leurs récepteurs de type tyrosine kinase, FGFR, qui se dimérisent et déclenchent des voies de signalisation liées à l'angiogenèse. De nombreuses études *in vitro* ont montré que le FGFa et le FGFb activent la prolifération et la migration des cellules endothéliales en stimulant leur transcription génétique. En effet, mises en culture avec du FGFa ou FGFb, les cellules endothéliales sécrètent des molécules spécialisées dans la dégradation (MMP-2, MMP-9) et la formation de la matrice extracellulaire, et expriment à leur surface cellulaire des intégrines et cadhérines ³⁰.

In vivo, il a été montré que la surexpression par thérapie génique de FGFb dans un modèle murin d'ischémie critique périphérique améliore la revascularisation post-ischémique. Toutefois, l'action du FGFb semble indirectement et partiellement dépendre du VEGF puisque l'utilisation d'anticorps anti-VEGF abolie son effet ³¹. De plus, des cellules endothéliales invalidées pour la voie de signalisation au FGF ne répondent plus au VEGF et présentent une diminution de l'expression de VEGFR-2. Le FGF stimule donc l'effet du VEGF en activant, via la voie Erk1/2 l'expression de son récepteur VEGFR-2 ³². Le FGFb joue également un rôle dans la maturation des vaisseaux puisqu'il stimule l'expression de facteurs inflammatoires comme MCP-1 (CCL2) par les cellules mésenchymateuses non-endothéliales telles que les cellules murales et les fibroblastes. La surexpression de CCL2 due

au FGFb est d'ailleurs indépendante du VEGF et ne s'observe pas chez les cellules endothéliales ³³.

- **PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)**

La famille des PDGF comporte 4 membres (PDGF-A, B, C, D) qui physiologiquement peuvent se présenter sous forme de dimères (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB) et sont connus pour leur rôle dans la maturation des vaisseaux.

En effet, les souris déficientes en PDGF-BB meurent in utéro suite à un défaut de maturation du plexus capillaire primitif dont le recouvrement par les cellules murales est compromis ³⁴. Il a de plus été montré que la sécrétion du PDGF-BB par les cellules endothéliales permet le recrutement des péricytes exprimant le récepteur PDGFR- β ³⁵. Un co-traitement VEGF-A/PDGF-BB chez le lapin permet d'ailleurs de potentialiser la perfusion du membre ischémique puisque, en plus de l'effet pro-angiogénique du VEGF-A, le PDGF-BB promeut la collatéralisation ³⁶. Le PDGF-BB semble également agir en synergie avec le FGFb puisque leur co-injection dans un modèle de rat ou de lapin d'ischémie du membre inférieur favorise la stabilisation sur le long terme du réseau vasculaire néoformé et le FGFb stimule l'expression des récepteurs aux PDGF-BB (PDGFR-a et PDGFR-b) ³⁷.

En plus de ce rôle dans la maturation des vaisseaux, le PDGF participe à la régénération vasculaire en activant la production de collagène par les fibroblastes et en induisant le chimiotactisme des cellules inflammatoires et le recrutement des cellules originaires de la moelle ³⁸. En effet, le PDGF-CC, notamment, montre des capacités à mobiliser les cellules médullaires, à stimuler leur migration et à induire leur différenciation en cellules endothéliales ou cellules musculaires lisses ³⁹.

c. NO

De part ses multiples rôles dans la vasodilatation des vaisseaux, l'activation du VEGF, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, le monoxyde d'azote (NO, Nitric Oxyde) est un acteur central de la revascularisation post-ischémique. Il est produit à partir de la L-arginine grâce à trois NO-synthases (NOS) différentes : la NOS1 (NOS neuronal, nNOS), produite constitutivement dans les tissus nerveux ; la NOS2 (NOS inductible, iNOS) exprimée uniquement en réponse à un stimulus souvent inflammatoire ; et la NOS3 (NOS endothéliale, eNOS, constitutive NOS, cNOS) constitutive et présente exclusivement dans l'endothélium. La eNOS, de part sa localisation, est celle dont le rôle dans la régénération vasculaire a été le plus étudié.

Les travaux de l'équipe de Isner ont montré qu'une augmentation de la production de NO chez des rats ayant une ischémie induite du membre inférieur améliore la revascularisation post-ischémique, alors que les souris eNOS^{-/-} présentent un défaut de régénération ⁴⁰. De plus, l'inhibition *in vitro* de la eNOS par le L-NAME bloque la migration des cellules endothéliales ainsi que l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 3$, essentielle pour leur adhérence et donc pour leur survie ⁴¹. D'autres travaux ont également montré que l'effet pro-angiogénique du VEGF passe par une augmentation de l'expression de la eNOS des cellules endothéliales ⁴². Le NO active également la production de VEGF et de FGFb par les cellules endothéliales et musculaires lisses ⁴³. D'ailleurs, la transfection par thérapie génique d'eNOS dans la patte ischémique de rat augmente de taux de VEGF intramusculaire, et l'administration d'un anticorps anti-VEGF abolie l'effet pro-angiogénique de ce traitement ⁴⁴. Enfin, le NO participe à la revascularisation post-ischémique en induisant la mobilisation des cellules médullaires et en affectant leur potentiel régénérateur (voir chapitre II.2.a.).

d. Forces hémodynamiques

Les forces hémodynamiques correspondent aux contraintes mécaniques induites par la pression et le flux sanguin (forces de cisaillement) sur la paroi vasculaire. Elles influent essentiellement sur la collatéralisation des artérioles préexistantes en induisant un épaissement de la paroi du vaisseau et une augmentation de son diamètre. La pression module plutôt l'épaisseur du vaisseau alors que les forces de cisaillements son diamètre ⁴⁵. L'augmentation des forces hémodynamiques en amont de l'occlusion est perçue par les cellules endothéliales notamment grâce aux intégrines de type $\alpha v \beta 3$ qui font le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette interne d'actine ⁴⁶. Plusieurs molécules extracellulaires sont capables de se lier et d'activer les intégrines qui, à leur tour, déclenchent différentes voies de signalisation intra cytoplasmique. Parmi elles, la lactadhérine qui en se liant aux intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$, active la voie de signalisation dépendante de VEGF-A/VEGFR-2 par phosphorylation d'Akt et promeut la revascularisation post-ischémique ⁴⁷. Les forces de cisaillements exercées sur les cellules endothéliales activent également d'autres voies de signalisation qui aboutissent à la production de molécules pro-artériogéniques comme le NO, le VEGF et de molécules chimio-attractantes comme le CCL2.

Si les cellules endothéliales sont les premières cellules directement touchées par ces contraintes, les cellules musculaires lisses subissent également la pression exercée par le flux sanguin et les étirements mécaniques. Ces forces hémodynamiques induisent la production de MMPs par les cellules musculaires lisses et activent la voie anti-apoptotique NF-kb qui permet leur survie et leur prolifération, favorisant ainsi l'épaissement et la dilatation du vaisseau ^{48 49}.

e. Micro-ARNs

- **Biogenèse des micro-ARNs**

Les micro-ARNs (miR) sont des ARN monobrin non codant d'environ 22 nucléotides qui inhibent l'expression d'ARNm spécifiques en se liant par complémentarité à leurs régions 3' UTR. De part leur rôle de répresseur post-transcriptionnel, ce sont d'excellents acteurs de l'épigénétique. On estime que le génome humain code pour plus de 1000 micro-ARNs. Certains micro-ARNs sont intergéniques ou polycistroniques et sont donc situés dans la partie non-codante entre deux gènes. Cependant, la plupart des micro-ARNs semblent localisés au niveau des introns des gènes et sont donc sous le contrôle du promoteur du gène le contenant⁵⁰. Il n'est pas rare que le micro-ARN intronique module les mêmes processus biologiques que la protéine codée par son gène hôte, révélant ainsi un système sophistiqué de contrôle négatif ou d'amplification de la voie induite par la protéine transcrite⁵¹.

Le gène codant pour un micro-ARN est tout d'abord transcrit sous une forme immature nommée « Pri-miR » qui est ensuite clivée par la ARNase Drosha pour donner un précurseur de 70 à 100 nucléotides, replié en tige-boucle imparfaite : le « Pré-miR ». Ce dernier est alors exporté vers le cytoplasme grâce à l'Exportine 5 où il sera clivé par Dicer pour former le duplex « miR :miR* ». Le micro-ARN mature, monobrin, intègre finalement le complexe protéique RISC (RNA-induced silencing complex) où il restera stable et indétectable par les ARNases.

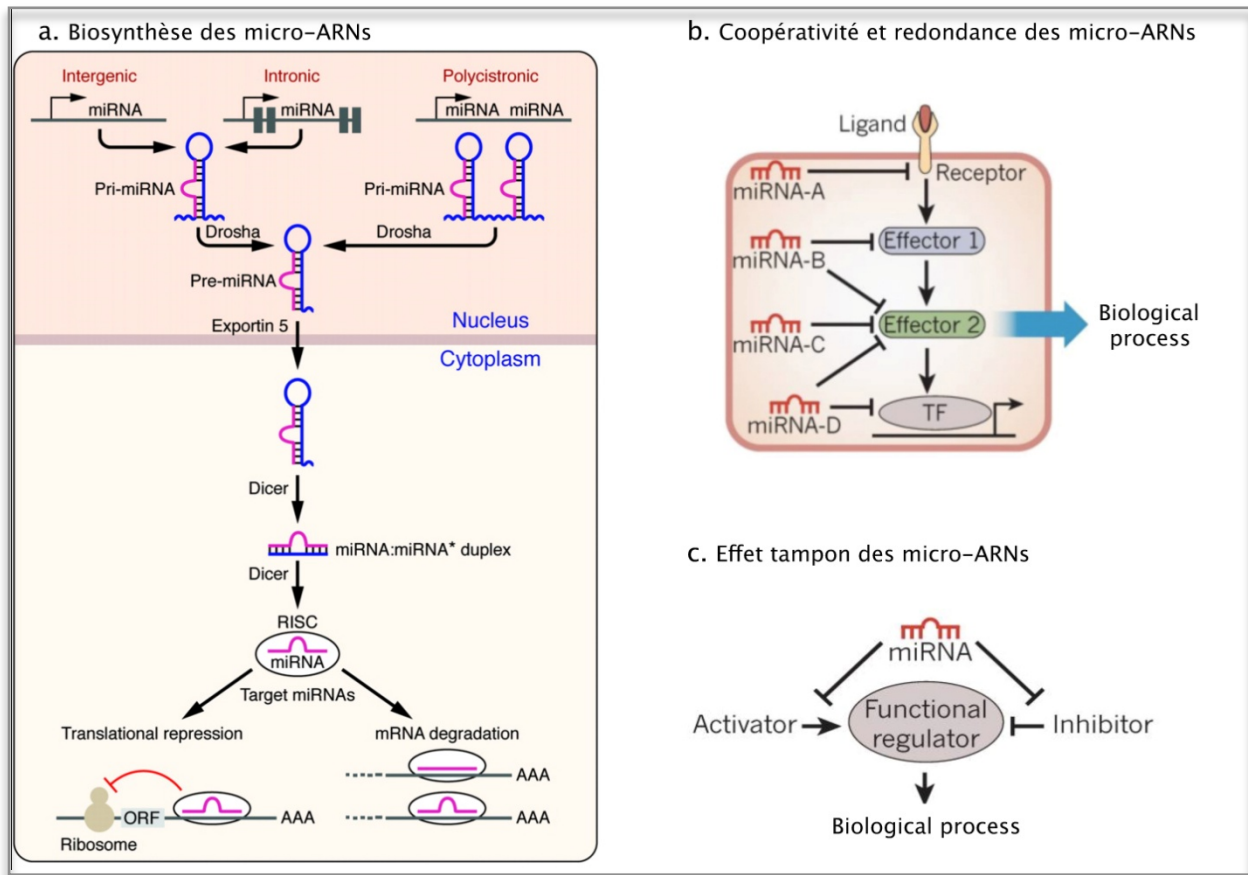


Figure 6: Biosynthèse et mécanismes d'action des micro-ARNs.

D'après van Rooij, *Circulation Research*, 2011 et Olson, *Nature*, 2011

- Mécanismes d'action des micro-ARNs

Les micro-ARNs stabilisés dans le complexe RISC inhibent la traduction d'ARNm selon trois mécanismes distincts. Lorsqu'il y a une complémentarité parfaite entre le micro-ARN et la région 3'UTR de l'ARNm, ce dernier est reconnu par des ARNases, dégradé et aucune traduction de la protéine cible n'a lieu. Lorsqu'il y a une complémentarité imparfaite, soit le micro-ARN inhibe l'action du ribosome, diminuant ainsi la traduction de la protéine cible ; soit le complexe micro-ARN/ARNm est reconnu par les P-Bodies, l'ARNm est alors dégradé et la protéine non produite. Un micro-ARN n'ayant qu'un effet inhibiteur, son effet dépend énormément de sa propre quantité. Si l'expression d'un micro-ARN diminue, cela lève une inhibition, les ARNm cibles sont de nouveau traduits, des protéines synthétisées et

un phénotype peut apparaître. Un micro-ARN ayant plusieurs cibles, il peut inhiber toute une cascade de signalisation et moduler un processus biologique entier, même si cela semble le plus souvent résulter de la coopération de plusieurs micro-ARNs. En fin, un micro-ARN peut avoir un effet tampon en inhibant les molécules activatrices et inhibitrices d'un même processus ⁵¹.

Etant donné le nombre de micro-ARNs et de leurs cibles qu'il reste à identifier et à décortiquer, l'étude des micro-ARNs est un nouveau grand champ d'investigation pour la compréhension et la régulation des mécanismes physiopathologiques. En particulier, les micro-ARNs semblent jouer un rôle d'importance dans la formation et le remodelage vasculaire.

- **Micro-ARNs et pathologies ischémiques**

L'importance des micro-ARNs dans l'angiogenèse embryonnaire a été mise en évidence grâce à la génération de souris *Dicer*^{-/-}. En effet, les embryons homozygotes meurent entre le 12.5 et le 14.5 jour de gestation, présentent une formation vasculaire très altérée et une expression de VEGF, Flt-1 et Tie-1 amoindrie ⁵². Depuis, différents micro-ARNs ont été ciblés et identifiés comme étant des modulateurs de la revascularisation post-ischémique. Récemment, des micro-ARN assays ont permis de révéler que l'expression d'un grand nombre de micro-ARNs était modulée par l'induction d'une ischémie du membre inférieur chez la souris: l'expression des miR-21 et miR-92a par exemple est augmentée alors que celle des miR-100 et miR-196a est diminuée. L'inhibition *in vitro* de miR-100 dans les cellules endothéliales augmentent d'ailleurs leurs capacités de prolifération et de formation de tube, via l'augmentation de l'expression de mTOR ⁵³. L'équipe de Dimmeler a également montré qu'une surexpression du miR-92a dans les cellules endothéliales bloquent leurs capacités pro-angiogéniques *in vitro* et *in vivo*; et que l'injection systémique d'un

antagomiR-92a chez des souris ayant une ischémie du membre inférieur améliorait la croissance vasculaire et la régénération tissulaire ⁵⁴. Il semble que l'effet anti-angiogénique du mir-92a passe par l'inhibition d'ARNm codant pour des facteurs pro-angiogéniques comme l'intégrine $\alpha 5$ et la eNOS ⁵⁴. Au contraire, le miR-126 a un effet pro-angiogénique. L'injection unique et systémique de l'antagomiR-126 dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur, altère l'angiogenèse mais pas l'artériogenèse ⁵⁵. Ce miR-126, spécifiquement exprimé dans les cellules endothéliales, a également un rôle protecteur de l'athérosclérose qu'il exerce en stimulant le recrutement de cellules progénitrices via la chimiokine CXCL12 ⁵⁶. Le miR-21, exprimé dans la grande majorité des tissus, aurait également un rôle pro-angiogénique puisque, dans un modèle de cellules tumorales, il a été montré qu'il inhibe PTEN, lui-même inhibiteur partiel des voies AKT et ERK qui activent HIF-1 α et donc la production de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF ⁵⁷.

f. Système hormonal : Angiotensine II

La revascularisation d'un tissu ischémique peut également être modulée par des facteurs hormonaux comme l'angiotensine II. L'angiotensine II est issue du clivage de l'angiotensine I par l'ECA (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine) et active deux types de récepteurs : AT1 et AT2. Ce peptide est principalement connu pour son rôle dans la régulation de la pression artérielle.

Cependant, il a été montré que l'angiotensine II stimulait, via son récepteur AT1, la vasoconstriction des artérioles et la régénération vasculaire. En effet, dans des conditions normoxiques, des cellules musculaires lisses stimulées avec de l'angiotensine II augmentent leur expression de HIF-1 α et de VEGF ⁵⁸. *In vivo*, l'injection d'angiotensine II dans un

modèle murin d'ischémie du membre inférieur améliore la revascularisation du tissu lésé et s'accompagne d'une augmentation de l'expression du VEGF ⁵⁹. De façon intéressante, cet effet pro-angiogénique est totalement aboli lorsqu'un inhibiteur du récepteur AT1 ou un neutralisant du VEGF-A est injecté en plus de l'angiotensine II. L'angiotensine II a donc un effet pro-angiogénique qui passe par son récepteur AT1 et la production de VEGF-A. Ce peptide régule également le recrutement des cellules inflammatoires nécessaires à la revascularisation post-ischémique via son récepteur AT1 puisque les souris AT1^{-/-} recevant de l'angiotensine II ne présentent aucune infiltration de cellules mononuclées ni aucune expression de CCL2 (CCL2) dans le muscle ischémique ⁵⁹. L'activation du récepteur AT2 semble au contraire avoir un effet anti-angiogénique. En effet, dans un contexte d'ischémie du membre inférieur, les souris invalidées pour le récepteur AT2 (AT2^{-/-}) revascularisent nettement mieux que les contrôles et présentent une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, corrélée avec une diminution du nombre de cellules apoptotiques dans le tissu lésé ⁶⁰. Malgré ces divergences, l'effet pro-angiogénique induit par AT1 semble prédominant sur AT2 puisque l'injection systémique d'angiotensine II améliore la revascularisation post-ischémique.

L'injection d'angiotensine II a donc un effet pro-angiogénique et l'idée que les inhibiteurs de l'ECA donnés aux patients hypertendus diminueraient l'angiogenèse peut paraître évidente. Pourtant, des rats naturellement hypertendus traités avec un inhibiteur de l'ECA augmentent leur densité capillaire ⁶¹. De plus, l'administration d'un inhibiteur de l'ECA à des souris ayant une ischémie périphérique induite conduit à une amélioration de la revascularisation et à une augmentation de l'expression de la eNOS ⁶². En effet, si l'ECA induit la formation de l'angiotensine II, elle est également à l'origine de la dégradation de la bradykinine. Or, les inhibiteurs de l'ECA n'ont aucun effet sur la revascularisation post-

ischémique des souris invalidées pour le récepteur 2 à la bradykinine (B(2)^{-/-})⁶². La bradykinine contribue donc certainement à l'effet pro-angiogénique des inhibiteurs de l'ECA. L'essai clinique OPTIMAL (Optimal trial in myocardial infarction with angiotensin II antagonist losartan) réalisé sur des patients ayant subi un infarctus du myocarde, a d'ailleurs montré que le groupe de patients traités avec un inhibiteur de l'ECA (captopril) présentait une mortalité totale bien plus faible que le groupe de patients traités avec un inhibiteur des récepteurs AT1 de l'angiotensine II (losartan).

g. Inflammation

La mobilisation et le recrutement des cellules inflammatoires sur le site de l'ischémie sont essentiels pour la revascularisation (cf chapitre II. et III.). Pour résumer succinctement la réaction inflammatoire qui suit l'occlusion d'une artère, il a été montré que les premières cellules à arriver sur le site de l'ischémie sont les lymphocytes T CD8⁺. Ces cellules vont alors permettre le recrutement des lymphocytes T CD4⁺ via leur sécrétion d'IL-16⁶³. Les CD4⁺ modulent ensuite l'angiogenèse et l'artériogenèse en permettant l'infiltration des monocytes qui sécrètent à leur tour de nombreux facteurs pro et anti-angiogéniques. Dans un modèle murin, dès le troisième jour après l'ischémie induite par ligature de l'artère, l'accumulation de monocytes est très importante et diminue vers le 7^{ème} jour post-ischémie. Les cellules NK (Natural Killer), les neutrophiles et les mastocytes jouent également un rôle dès les premiers jours qui suivent l'ischémie (cf chapitre II. 1.)

La diversité des cellules inflammatoires mobilisées (cf chapitre II. 1.) et le nombre de cytokines et de facteurs de croissance qu'elles sécrètent font de la réaction inflammatoire un mécanisme complexe. En effet, les monocytes par exemple ont un effet pro-angiogénique et pro-artériogénique post-ischémique nettement plus prononcé que les cellules dendritiques ou

les macrophages ⁶⁴. sDe plus, des facteurs pro-angiogéniques comme les interleukines IL-6 et IL-1 β sont sécrétés en même temps que d'autres facteurs anti-angiogéniques tels que l'IL-18 et l'IL-10.

En effet, l'IL-10 est une interleukine anti-inflammatoire et anti-angiogénique. Elle inhibe le processus de revascularisation dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur en régulant négativement la production de métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9) et de VEGF ^{65 62}.

IL-18 a également un rôle anti-angiogénique. L'injection d'un inhibiteur de l'IL-18 (IL-18 Binding Protein, IL-18BP) dans la patte ischémique de souris stimule la régénération vasculaire en association avec une activation de la voie VEGF/AKT et une augmentation de la mobilisation et de la différenciation de cellules progénitrices endothéliales originaires de la moelle ⁶⁶.

L'IL-1 β , sécrétée par certains leukocytes comme les monocytes/macrophages, possède une forte activité pro-angiogénique. Les souris IL-1 $\beta^{-/-}$ ayant une ischémie périphérique présente une revascularisation amoindrie due à une diminution du recrutement de cellules progénitrices endothéliales et de l'expression de HIF-1 α , VEGF, VEGFR-2 et de VCAM-1 ⁶⁷.

Ainsi, la balance entre la quantité de cellules et le nombre de facteurs pro et anti-angiogéniques régit l'effet délétère ou bénéfique de l'inflammation sur la revascularisation post-ischémique.

Les processus impliqués dans la revascularisation post-ischémique nécessitent la présence de cellules inflammatoires, qui sont mobilisées depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine, puis recrutées sur le site de l'ischémie. Cependant, depuis la découverte en 1997 par Asahara de progéniteurs endothéliaux dans le sang de patients atteints d'ischémie périphérique, nous savons que des progéniteurs vasculaires sont également mobilisés depuis

la moelle, puis recrutés dans le tissu lésé et participent à la vasculogénèse post-ischémique (cf chapitre IV).

Même s'il a récemment été montré que les cellules progénitrices et les cellules inflammatoires ne proviennent pas exclusivement de la moelle osseuse, ce travail de thèse se concentre essentiellement sur les mécanismes de mobilisation et de recrutement des cellules médullaires.

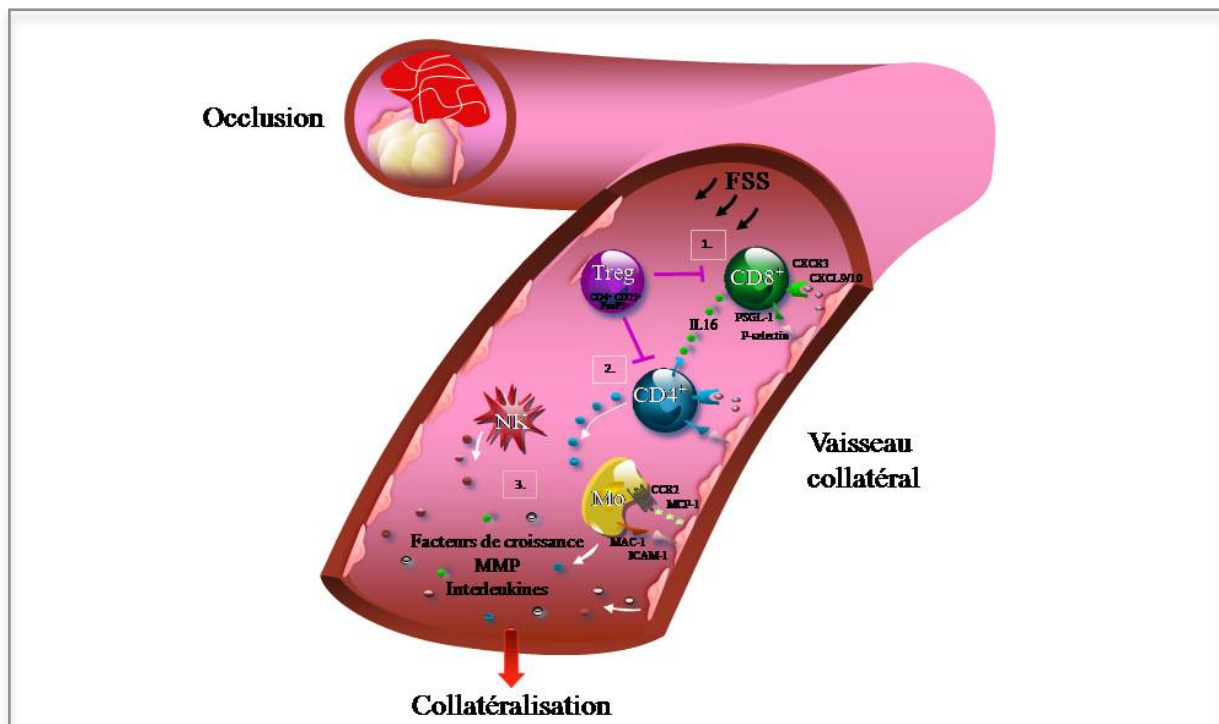


Figure 7: Les différentes étapes de la réaction inflammatoire suite à l'occlusion d'un vaisseau.

1. Arrivée des lymphocytes T CD8+ et sécrétion d'IL-16.
2. Recrutement des lymphocytes T CD4+ par l'IL-16.
3. Recrutement des monocytes/macrophages facilité par les lymphocytes T.

II. Mobilisation des cellules médullaires

1. Les différents types cellulaires mobilisés

Suite à l'occlusion d'un vaisseau, un grand nombre de cellules originaires de la moelle osseuse sont mobilisées dans la circulation sanguine, puis recrutées sur le site de l'ischémie. Ces cellules médullaires dérivent de progéniteurs communs que l'on peut grossièrement diviser en deux grandes catégories : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces deux types de cellules souches adultes sont multipotentes, c'est-à-dire capables de se renouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires.

Les CSH sont caractérisées chez la souris par les marqueurs [CD34+ cKit+ Sca1+ Lin- CD45-]. Elles sont à l'origine de la lignée myéloïde et de la lignée lymphocytaire. Les progéniteurs communs myéloïdes donnent les cellules érythropoïétiques (megakaryocytes, érythrocytes), les granulocytes (basophiles, neutrophiles, éosinophiles, monocytes) et les mastocytes. Les progéniteurs communs lymphocytaires donnent naissance aux cellules NK et aux lymphocytes T et B.

Les CSM originaires de la moelle sont caractérisées par les marqueurs [CD166+ CD105+ CD90+ CD34- CD45- cKit-]. Elles sont capables de se différencier en un grand nombre de cellules mûres telles que les ostéocytes, chondrocytes, astrocytes, adipocytes, cellules stromales, fibroblastes et myocytes.

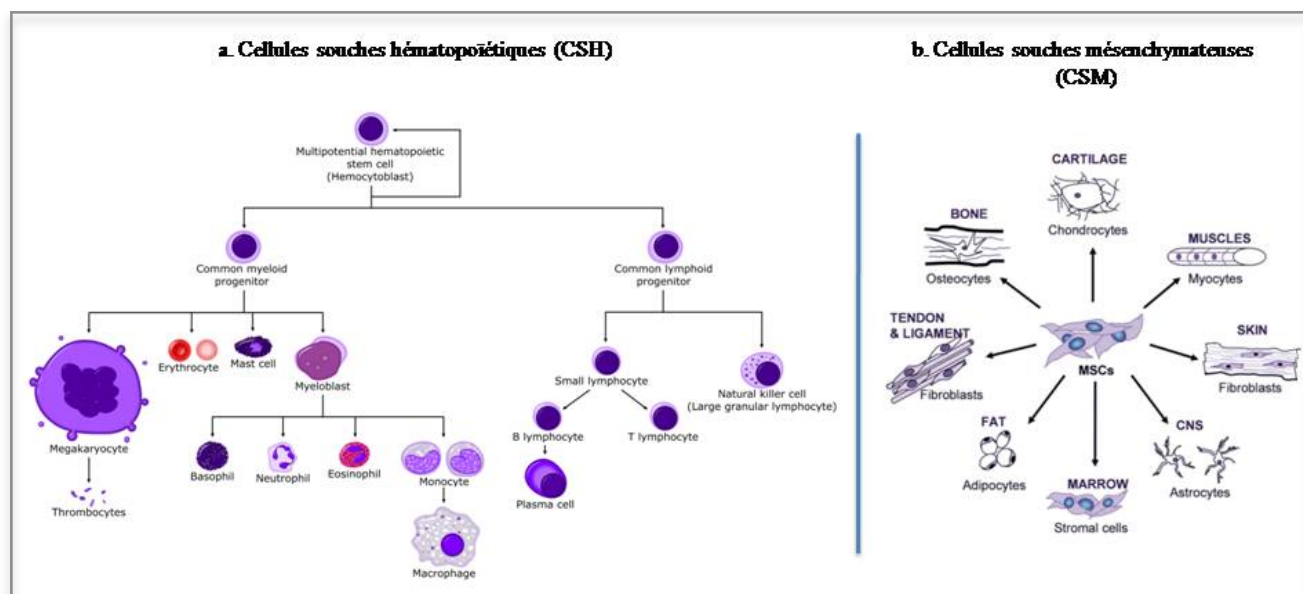


Figure 8: Lignées cellulaires hématopoïétique et mésenchymateuse.

a. Cellules myéloïdes

Les principales cellules myéloïdes étudiées dans la revascularisation post-ischémique sont les monocytes, les neutrophiles et les mastocytes.

- **Monocytes et macrophages**

Les monocytes et macrophages sont des cellules inflammatoires ayant des propriétés de phagocytose. Les macrophages résultent de la différenciation de monocytes dans le tissu. Plusieurs études menées par l'équipe de Schaper ont montré que les monocytes sont recrutés dans le tissu ischémique grâce à l'interaction entre leur récepteur CCR2 et la chimiokine CCL2 (CCL2), qu'ils stimulent l'artériogénèse et la collatéralisation en sécrétant des facteurs de croissance (VEGF), des cytokines et des métalloprotéinases (MMP-9) ^{68 69 70}. Ils ont également mis en évidence une corrélation entre le nombre de monocytes circulants et

l'étendue de la collatéralisation post-ischémique chez le lapin ayant l'artère fémorale ligaturée, montrant ainsi le rôle déterminant de ces cellules dans le remodelage vasculaire ⁶⁴.

Les monocytes murins comprennent au moins deux sous groupes phénotypiquement différents : les [Ly6C^{hi} 7/4^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{lo}] dits « Ly6C^{hi} » et les [Ly6C^{lo} 7/4^{lo} CCR2⁻ CX3CR1^{hi}] dits « Ly6C^{lo} » qui correspondent respectivement chez l'homme aux monocytes [CD14^{hi} CD16⁻] et [CD14^{lo} CD16⁺] ⁷¹. Dans un modèle murin, les deux types de monocytes sont mobilisés dans la circulation sanguine après ligature de l'artère fémorale via la voie de signalisation CCL2/CCR2. Les Ly6C^{hi} sont majoritairement présents dans le tissu lésé dès le 3^{ème} jour après l'ischémie alors que les Ly6C^{lo} sont plutôt recrutés à la fin de la phase inflammatoire aiguë, vers le 5^{ème}/7^{ème} jour ⁷². Une fois dans le tissu ischémique, ces deux sous-types cellulaires ont les mêmes capacités de phagocytose, mais les Ly6C^{hi} sécrètent essentiellement des protéinases alors que les Ly6C^{lo} du VEGF. Il a donc été suggéré que les Ly6C^{lo} représentaient le sous groupe de monocytes pro-angiogéniques. Cependant, le rôle du VEGF d'origine myéloïde dans l'angiogenèse reste très controversé et mal compris. D'ailleurs, seule l'injection en intraveineux de Ly6C^{hi}- et non de Ly6C^{lo}- induit une amélioration de la revascularisation post-ischémique ⁷².

- **Neutrophiles**

Les neutrophiles sont des leucocytes polymorphonucléaires caractérisés parmi les cellules mononuclées par les marqueurs [Ly6G⁺ CD11b⁻]. Même si ces cellules inflammatoires sont les premières à être recrutées sur le lieu de l'ischémie, elles ont un rôle délétère pour la régénération vasculaire ⁷³. Dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez le rat, ajouter des leucocytes polymorphonucléaires à des cellules mononuclées de sang périphérique (PB-MNCs) et plaquettes, atténuent l'effet pro-angiogénique induit par les PB-

MNCs et plaquettes. Cet effet anti-angiogénique proviendrait de l'élastase qu'elles sécrètent ⁷⁴. De plus, les neutrophiles sont capables de libérer d'importantes quantités de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui, à forte concentration, ont un effet délétère direct sur les cellules endothéliales et limitent donc la revascularisation post-ischémique ⁷³.

- **Mastocytes**

Les mastocytes sont des cellules qui ne se différencient qu'une fois infiltrées dans le tissu cible et qui se caractérisent à l'aide des marqueurs [FcεRIα+, cKit+, CD34-]. Ce sont des cellules immunitaires bien connues pour leur rôle dans les réactions d'hypersensibilité immédiate qu'elles initient via leur récepteur aux IgE (FcεRIα). Des études *in vitro* ont montré qu'elles sont également capables de sécréter des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, l'angiopoïétine-1 et l'IL-8 lorsqu'elles sont activées par l'adénosine ⁷⁵. Depuis, le rôle des mastocytes dans la régénération vasculaire a surtout été étudié dans l'ischémie cardiaque où il reste très controversé. Certaines études montrent que le contenu des granules de ces cellules a un effet anti-apoptotique sur les cardiomyocytes de rats ayant un infarctus du myocarde alors que d'autres travaux montrent au contraire que l'inhibition de la dégranulation des mastocytes a un effet bénéfique sur le remodelage cardiaque ^{76 77}. Dans l'ischémie du membre inférieur murin, l'augmentation de la mobilisation des mastocytes et de l'activation de leur sécrétion de VEGF et de MMP-9, induite par une faible irradiation des souris, favorise la revascularisation post-ischémique ⁷⁸.

b. Cellules lymphocytaires

- **Les Lymphocytes T**

Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont des acteurs majeurs des processus de revascularisation post-ischémique. En effet, les souris nudes -dépourvues de lymphocytes T- les souris CD4^{-/-} et les CD8^{-/-} présentent une revascularisation amoindrie consécutivement à l'induction d'une ischémie du membre inférieur^{79 80 63}. De plus, les taux d'IL-16 et le nombre de lymphocytes T CD4⁺ présents sur le site de l'ischémie sont diminués chez les souris CD8^{-/-}, montrant ainsi que les cellules CD8⁺ sont les premiers lymphocytes à arriver dans le tissu ischémique et qu'elles recrutent les cellules CD4⁺ via l'IL-16⁶³. Le rôle de ces cellules dans les processus de régénération vasculaire est essentiellement paracrine, avec la sécrétion notamment de VEGF. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ participent également au recrutement et à l'activation des monocytes. Il a été montré que prétraiter *in vitro* les monocytes avec des facteurs provenant de lymphocytes T augmente leurs capacités pro-angiogéniques⁸¹.

- **Lymphocytes T régulateurs (Treg)**

Les lymphocytes T régulateurs, sous groupe de lymphocytes T CD4⁺ identifiés par les marqueurs [CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺], sont connus pour leurs capacités à supprimer la réponse immunitaire et à contrôler l'homéostasie des lymphocytes T. L'interaction entre CD28 et son ligand B7 est essentielle à la formation de Treg. Des modèles de souris déficientes en Treg comme les CD28^{-/-} ou B7^{-/-} montrent une amélioration de la revascularisation post-ischémique après ligature de l'artère fémorale. L'absence de Treg chez ces souris est associée à une augmentation dans le muscle ischémique de lymphocytes T et de macrophages. Ainsi, dans un modèle d'ischémie du membre inférieur, les Treg inhibent la régénération vasculaire en régulant négativement les lymphocytes T⁸²

- **Les cellules NK (Natural Killer)**

Les cellules NK, lymphocytes caractérisés par le marqueur NK1.1, modulent également la revascularisation post-ischémique des membres inférieurs puisque l'artériogénèse est affectée chez des souris NK^{-/-} ou déplétées en cellules NK. Cependant, les souris NKT^{-/-} ne présentent pas de défaut de vascularisation post-ischémique, montrant ainsi que seules les NK jouent un rôle majeur ⁸³.

c. Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentent un groupe hétérogène de cellules multipotentes qui peuvent également être identifiées comme étant des cellules stromales (murine marrow-derived stromal cells – MSCs) ou des MAPCs (multipotent adult progenitor cells). Elles sont définies selon plusieurs critères comme l'adhérence au plastique, la capacité à se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes, l'expression des marqueurs de surface CD90, CD105 et CD73 et l'absence des marqueurs hématopoïétiques tels que CD45, CD34 ou CD19. Ces cellules étant capables de se différencier en un grand nombre de types cellulaires tels que les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses, leur présence sur le site de l'ischémie contribue à la régénération vasculaire et tissulaire. Elles ont également un rôle sécrétoire puisque des études *in vitro* ont montré la présence dans leur surnageant de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGFb, le PlGF ou encore CCL2. Le surnageant de ces cellules induit d'ailleurs de façon dose-dépendante la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses *in vitro* ⁸⁴. L'injection de MSCs améliore le flux sanguin et diminue l'atrophie musculaire et la fibrose dans la patte ischémique de souris ayant l'artère fémorale ligaturée, mais ne semble pas incorporer les collatérales ⁸⁴. L'injection de MAPCs en intramusculaire dans un modèle murin

d'ischémie périphérique, améliore également la croissance vasculaire et musculaire post-ischémique. Il semble que les MAPCs induisent une augmentation de l'expression de la P-selectine à la surface des cellules endothéliales et le nombre de monocytes CX3CR-1+ dans le muscle ischémique. L'effet pro-angiogénique des MAPCs semble donc venir du fait qu'elles stimulent le recrutement des monocytes en activant les cellules endothéliales et en augmentant le chimiotactisme ⁸⁵. De façon intéressante, l'utilisation de CSM plus engagées dans la voie de différenciation vasculaire (MAPC-VP – vascular progenitor), ne potentialise ni la régénération tissulaire ni la croissance vasculaire ⁸⁶.

d. Cellules progénitrices endothéliales

Les cellules progénitrices endothéliales humaines (hCPE) ont été isolées pour la première fois par Asahara en 1997. Identifiées parmi les cellules mononuclées du sang périphérique humain grâce à des billes recouvertes d'anticorps pour CD34, ces cellules CD34+ expriment après 7 jours de culture les marqueurs de cellules endothéliales (CD31, Flk-1, Tie-2, E-selectine). Ce sont donc des cellules qui expriment des marqueurs hématopoïétiques comme CD34 et CD133, et des marqueurs vasculaires comme le VEGFR-2. L'injection de ces CPE-CD34+ en intraveineux chez des souris ou des lapins ayant une ischémie induite du membre inférieur a non seulement permis d'améliorer la revascularisation post-ischémique mais ces cellules se sont également incorporées aux vaisseaux néoformés ⁸⁷. Par la suite, les travaux menés par l'équipe de Rafii ont montré que des CPE étaient également mobilisées rapidement depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine lors d'un traumatisme vasculaire. En effet, ils ont constaté une élévation du nombre de CPE circulantes (CD133+ VEGFR-2+) dans le sang périphérique de patients présentant une défaillance vasculaire suite à des brûlures ou un pontage aorto-coronarien dès les 6 à 12

premières heures suivant le traumatisme vasculaire, pour revenir à des taux basaux 48 à 72 heures après⁸⁸.

Depuis, d'autres progéniteurs ont été identifiés dans d'autres tissus avec des marqueurs et des propriétés quelque peu différentes. Ce paragraphe tente de classer succinctement les différents types de CPE connues actuellement⁸⁹.

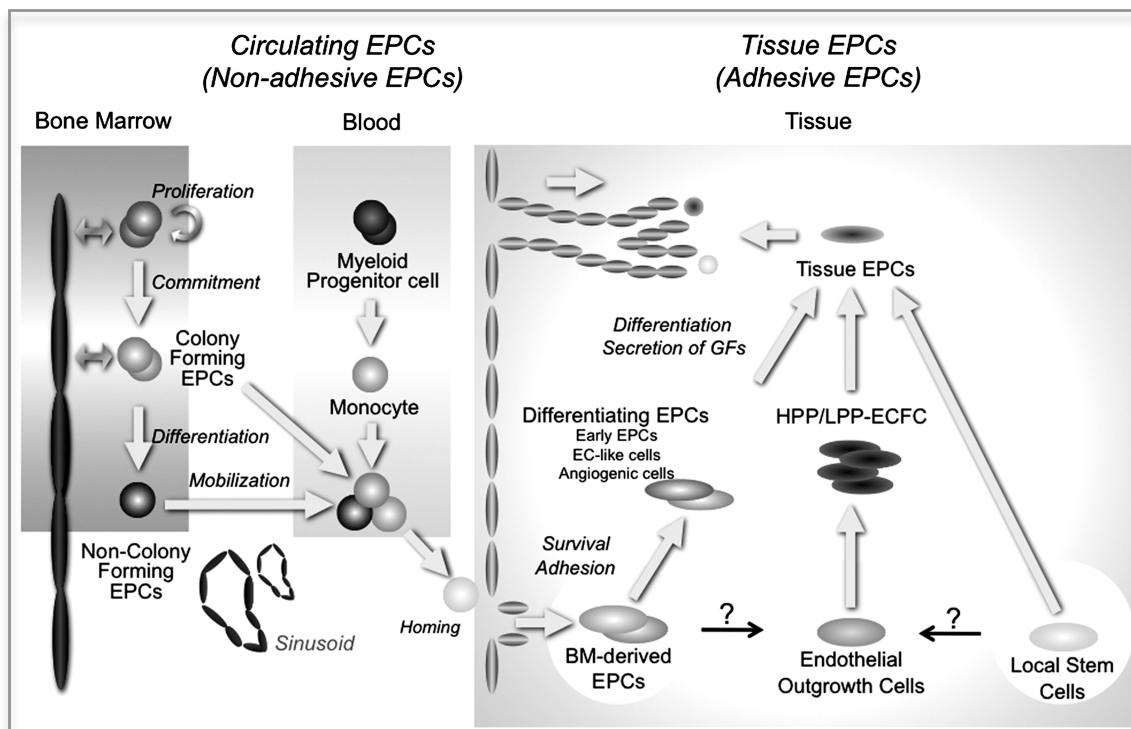


Figure 8: Les différents types de CPE identifiées à l'heure actuelle. D'après Asahara T, 2011.

- **CPE tissulaires et circulantes**

Les CPE tissulaires sont des cellules qui adhèrent à un tissu et qui peuvent être considérées comme des cellules souches endogènes à un organe au même titre que les progéniteurs cardiaques ou neuronaux. Les CPE circulantes sont des composants intégrants du sang qui peuvent être isolées à partir du sang périphérique, de la moelle osseuse, du sang de cordon ombilical ou des vaisseaux sanguins. La plupart des études précliniques et cliniques,

ont utilisé ces CPE circulantes comme source de CPE pour la thérapie cellulaire. Elles peuvent également être classées selon leur origine hématopoïétique (h-CPE) ou non-hématopoïétique (nh-CPE), selon leurs caractéristiques *in vitro* à former des colonies (Colony Forming EPC) ou pas (Non-Colony Forming EPC), et également selon leurs capacités angiogènes. Enfin, il existe les CPE dites « précoces » ou « tardives ».

- **Hématopoïétiques et non-hématopoïétiques CPE**

Les CPE hématopoïétiques (h-CPE) représentent la sous-population pro-vasculogénique des CSH que l'on retrouve dans la moelle osseuse, la circulation sanguine ainsi que dans le tissu ischémique dans lequel elles sont recrutées. Trois sous catégories d'h-CPE ont actuellement été identifiées :

- Les h-CPE qui descendent directement des CSH, forment tout d'abord des colonies de cellules immatures puis se différencient en véritables CPE circulantes.
- Les h-CPE issues de progéniteurs myéloïdes qui sont déjà engagés dans la lignée myéloïde mais sont capables de se différencier en cellules à phénotype endothélial.
- Les h-CPE appelées « cellules angiogéniques circulantes » qui présentent un phénotype endothélial et contribuent à la néovascularisation essentiellement grâce à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques.

Malgré cette classification, il est à l'heure actuelle difficile de faire une nette distinction entre CSH et CPE car ces deux types cellulaires partagent de nombreux marqueurs de surface, et aucune combinaison de marqueurs spécifiques et sélectifs pour les CPE n'est à l'heure actuelle connue.

Les nh-CPE, isolées à partir du sang ou de tissus, sont des cellules caractérisées uniquement *in vitro* grâce à des techniques d'adhérence cellulaire et à des marqueurs spécifiques endothéliaux décrits par Ingram DA et Yoder MC. Plus couramment nommées

EOC (Endothelial Outgrowth Cell), ces cellules apparaissent après une longue période de culture *in vitro* (7 à 30 jours) et présentent des capacités prolifératives importantes.

- **CPE précoces et CPE tardives**

De récentes techniques de culture *in vitro* ont été développées afin d'isoler, d'identifier et de purifier les CPE circulantes et tissulaires. La mise en culture de MNC issues du sang périphérique ou de la moelle osseuse de patients met en évidence l'existence de deux lignées endothéliales adhérentes : les CPE précoces et les CPE tardives.

CPE précoces : Les CPE précoces sont définies par le fait d'être identifiables après un temps court de mise en culture et par leur grande capacité à sécréter des facteurs pro-angiogéniques. A l'heure actuelle, il existe deux techniques de préparation des CPE précoces.

La première, développée par Asahara, consiste en la mise en culture de BM-MNC ou de PB-MNC sur une matrice de gélatine ou de fibronectine avec un milieu de culture riche en facteurs angiogéniques comme le VEGF. En ne conservant que les cellules adhérentes après 4 à 7 jours de culture, des colonies de CPE précoces se développent. Récemment, l'équipe d'Asahara a identifié deux types de colonie de CPE précoces qui se développent dans les mêmes conditions : des colonies dites « petites » qui correspondent à des CPE « primitives » ayant un fort potentiel prolifératif et qui seraient capables de se différencier en CPE dites définitives ; et des colonies dites « larges » qui correspondent aux CPE « définitives » et ont une activité vasculogénique et une capacité à former des tubes bien plus importantes que les CPE primitives.

La deuxième méthode, développée en 2003 par Hill, consiste également en la mise en culture de MNC mais en la récupération, cette fois, des cellules non adhérentes après 5 jours de culture. Les colonies formées à partir de ces cellules non adhérentes présentent toutes les caractéristiques des CPE précoces ⁹⁰.

Il est important de noter que les CPE précoces sont en fait une population assez hétérogène composée de cellules hématopoïétiques qui partagent des caractéristiques de cellules inflammatoires comme les lymphocytes T et monocytes ⁹¹. Le terme de « progéniteur endothélial » est d'ailleurs actuellement remis en question pour ces cellules.

CPE tardives : Les CPE tardives sont des colonies adhérentes qui apparaissent après 1 à 3 semaines de mise en culture de MNC. Elles ont été caractérisées en opposition aux CPE précoces par l'équipe de Yoon CH en 2004 selon leurs capacités *in vitro* à former des tubes endothéliaux et grâce à leur expression de marqueurs endothéliaux comme le VEGFR2. Ingram David a également montré dans le même temps l'existence de CPE de même type mais isolées à partir de sang périphérique ou de sang de cordon. Il a d'ailleurs identifié deux sous-populations de CPE classées, comme pour les CSH, selon leurs capacités proliférative et clonogénique : les HPP-ECFC (High proliferative potential-endothelial colony forming cell) et les LPP-ECFC (Low proliferative potential-endothelial colony forming cell) ⁹². Aujourd'hui, qu'elles soient hématopoïétiques ou non, les CPE tardives sont communément appelées ECFC (Endothelial Colony Forming Cell) et sont reconnues comme étant une population bien plus homogène que les CPE précoces ayant un phénotype strictement endothélial. Ceci rend d'ailleurs la distinction entre HUVEC et ECFC difficile *in vitro*, même si *in vivo* les ECFC ont un potentiel de néovascularisation que les HUVEC n'ont pas.

Malgré leurs potentiels, les ECFC ont été peu étudiées car elles n'existent pas dans le sang murin. De plus, leur génération en culture à partir de sang périphérique est difficile à obtenir chez l'homme, voir impossible chez certains patients, car elle nécessite un très grand volume de sang. Les ECFC isolées à partir du sang périphérique adulte ont également un potentiel de prolifération moindre que leurs homologues issus du sang de cordon humain ⁹². Ainsi, malgré leurs caractéristiques *in vitro* très prometteuses, l'utilisation d'ECFC issues du

sang périphérique en thérapie cellulaire n'en est qu'à ses débuts et nécessite encore de nombreuses recherches afin de potentialiser leur isolation et leur efficacité.

Malgré ces divergences et la difficulté à identifier clairement ces cellules, la thérapie cellulaire à l'aide d'EPC représente une des stratégies potentielles de traitement des maladies ischémiques (cf chapitre IV. 1. c.).

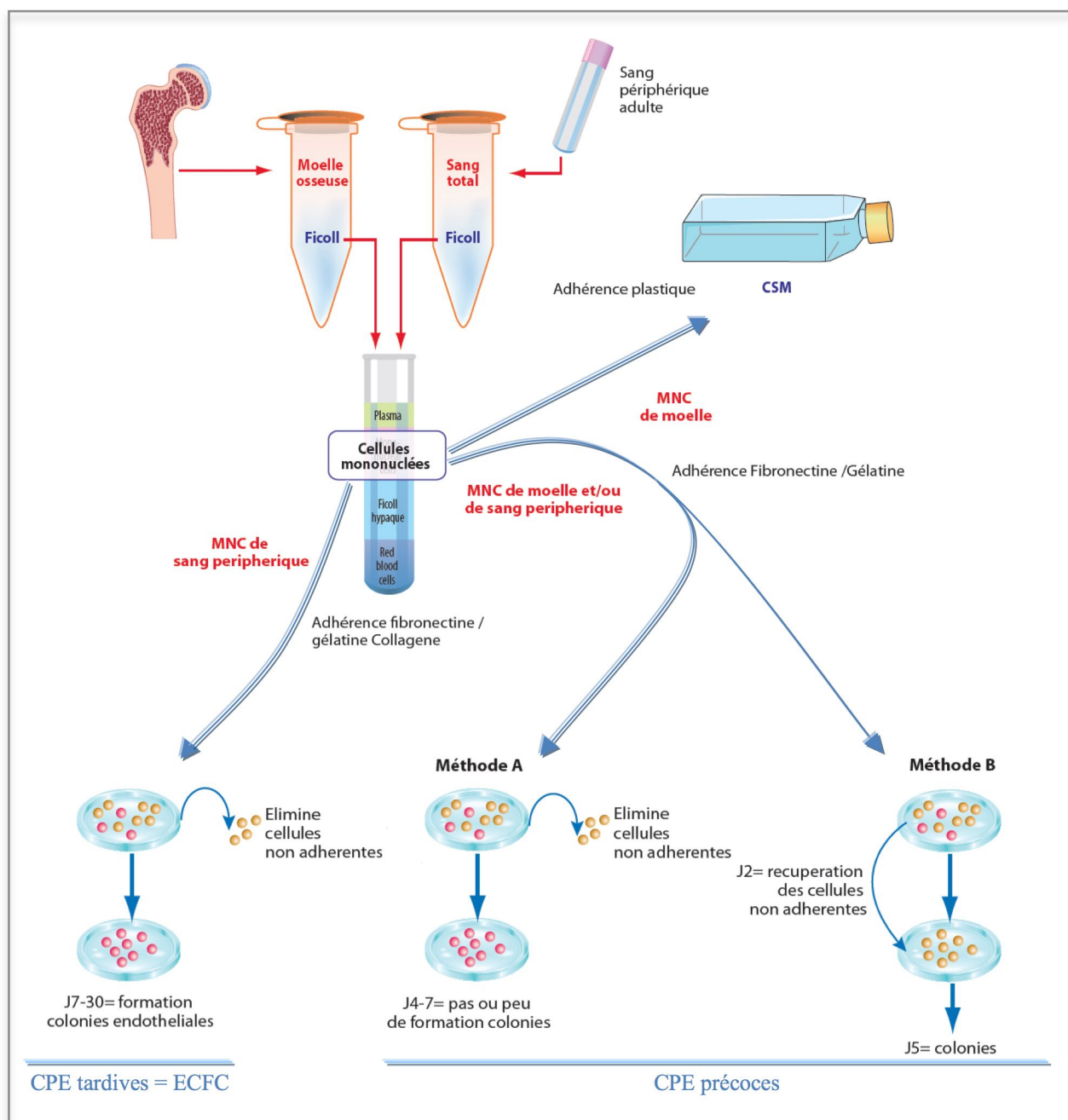


Figure 9: Méthodes de préparation des CPE tardives et précoces humaines.

D'après JS. Silvestre, B. Lévy et D. Smadja, 2012.

e. Progéniteurs des cellules musculaires lisses

Après la découverte des CPE en 1997, il est devenu de plus en plus évident que la vasculogénèse et la collatéralisation dépendaient également du recrutement de cellules progénitrices des cellules musculaires lisses (CPML). Ces cellules ont été isolées et identifiées pour la première fois dans le sang périphérique humain en 2002 ⁹³. Depuis d'autres CPML ont été identifiées et, comme les CPE, elles restent encore mal définies. Elles peuvent être circulantes ou localisées dans la moelle osseuse, la paroi vasculaire ou la zone périvasculaire ; sont caractérisées par des marqueurs de progéniteurs et de cellules musculaires lisses ; et se différencient dans certaines conditions en cellules musculaires lisses mûres *in vitro* et *in vivo* ⁹⁴. Il a également été montré qu'en mettant en culture des mononuclées CD34+ issus du sang de cordon humain, deux colonies se forment et se distinguent de part leur morphologie en forme de pavé ou de fuseau. Ces cellules en forme de pavé expriment des marqueurs endothéliaux et ont été définies comme étant des CPE alors que celles fuselées expriment des marqueurs de cellules musculaires lisses (α -SMA, SMHC) et correspondent aux CPML. Mises en culture ensemble, ces deux types de progéniteurs forment un réseau de capillaires ⁹⁵. *In vivo*, l'injection intraveineuse de CPML dans un modèle murin d'ischémie périphérique améliore la revascularisation post-ischémique. Cet effet est nettement amélioré lorsque des CPE sont co-administrées avec les CPML, montrant ainsi l'intérêt des co-traitements en thérapie cellulaire ⁹⁶.

2. Mécanismes de mobilisation de la moelle vers le sang

Les cellules souches décrites précédemment sont notamment localisées dans la moelle osseuse au niveau des niches ostéoblastiques et périvasculaires. Ces niches, structure anatomique et fonctionnelle qui assurent la maintenance et la régulation des fonctions des cellules souches, restent encore assez mal localisées et décrites. Les niches ostéoblastiques contiendraient les cellules souches hématopoïétiques et seraient localisées près de l'endoste, les cellules de la lignée ostéoblastique étant leur principal composant. Les niches périvasculaires seraient essentiellement constituées de cellules endothéliales et de cellules souches mésenchymateuses intégrées à la paroi vasculaire. Toutefois, il a été montré que des CSH pouvaient également se trouver dans les zones périvasculaires. De plus, une sous-population particulière de cellules mésenchymateuses exprimant la nestine, jouerait un rôle essentiel dans la régulation de la rétention des CSH via la production de la chimiokine CXCL-12. Si la question de la dualité ou de l'unicité de la niche ostéoblastique et périvasculaire n'est actuellement pas tranchée, il semble toutefois que, indépendamment du modèle, la niche soit constituée d'un duo entre cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques.

a. Inhibition de la rétention : système MMP-9/ cKit/ CXCL12/ eNOS

Les travaux menés par l'équipe de Rafii ont montré qu'après un traumatisme vasculaire l'augmentation du nombre de CPE circulantes était corrélée à une élévation du taux plasmatique de VEGF-A ⁸⁸. De même, en injectant en intraveineux du VEGF₁₆₅ dans des souris saines, ils ont constaté une augmentation du nombre de cellules souches d'origine médullaire (CSH et CPE) dans la circulation sanguine. Ils ont ainsi suggéré que la sécrétion

de VEGF suite à une ischémie induit la mobilisation des cellules médullaires via la chimiokine CXCL12 ⁹⁷. En effet, CXCL12 (SDF-1, Stroma-derived factor-1) est produit dans la moelle osseuse par les cellules stromales et permet la rétention de toutes les cellules exprimant son récepteur CXCR4. L'augmentation de l'activation de la métalloprotéinase MMP-9 est corrélée avec une diminution du taux de CXCL12 dans la moelle, révélant ainsi la capacité des MMP-9 à dégrader le CXCL12 et donc à libérer les cellules CXCR4+ vers la circulation sanguine ⁹⁸. Les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et B, les plaquettes et les cellules CD34+ expriment le CXCR4, faisant de l'axe CXCL12/CXCR4 un régulateur important de la rétention, de la mobilisation et du recrutement des cellules médullaires depuis la moelle vers le tissu ischémique (cf chapitre III).

L'interaction entre le récepteur cKit (CD117) présent sur les cellules progénitrices, et son ligand membranaire KitL présent sur les cellules stromales, permet également la rétention des cellules souches dans la moelle osseuse. Les travaux de Rafii ont montré que le VEGF active la MMP-9 médullaire qui va cliver KitL, libérer le KitL soluble (sKitL) et induire la translocation des cellules souches cKit+ en dehors de leur niche où elles pourront proliférer et migrer dans la circulation sanguine ^{99 100}. En effet, les souris MMP-9^{-/-} présentent une altération de la libération de sKitL et de la mobilisation des cellules médullaires qui ne sont pas rétablies avec l'ajout de VEGF. Ainsi, le VEGF produit par les cellules du tissu ischémique active les MMP-9 de la moelle osseuse qui, en dégradant CXCL12 et en clivant cKitL, vont inhiber la rétention des cellules médullaires et permettre leur mobilisation.

Le NO joue également un rôle dans la mobilisation des cellules. Les souris déficientes en eNOS (Nos3^{-/-}) et ayant une ischémie du membre inférieur présentent un défaut de mobilisation des progéniteurs endothéliaux induite par le VEGF et une diminution du taux de MMP-9 dans la moelle osseuse ¹⁰¹. En effet, les cellules endothéliales et certaines cellules stromales de la moelle expriment le Flk-1 (VEGFR-2). L'augmentation de l'expression de

VEGF due à l'hypoxie active la eNOS des cellules médullaires via le récepteur Flk-1, ce qui induit la production locale de NO qui va non seulement activer la MMP-9 mais également la prolifération et la différenciation de cellules souches ¹⁰².

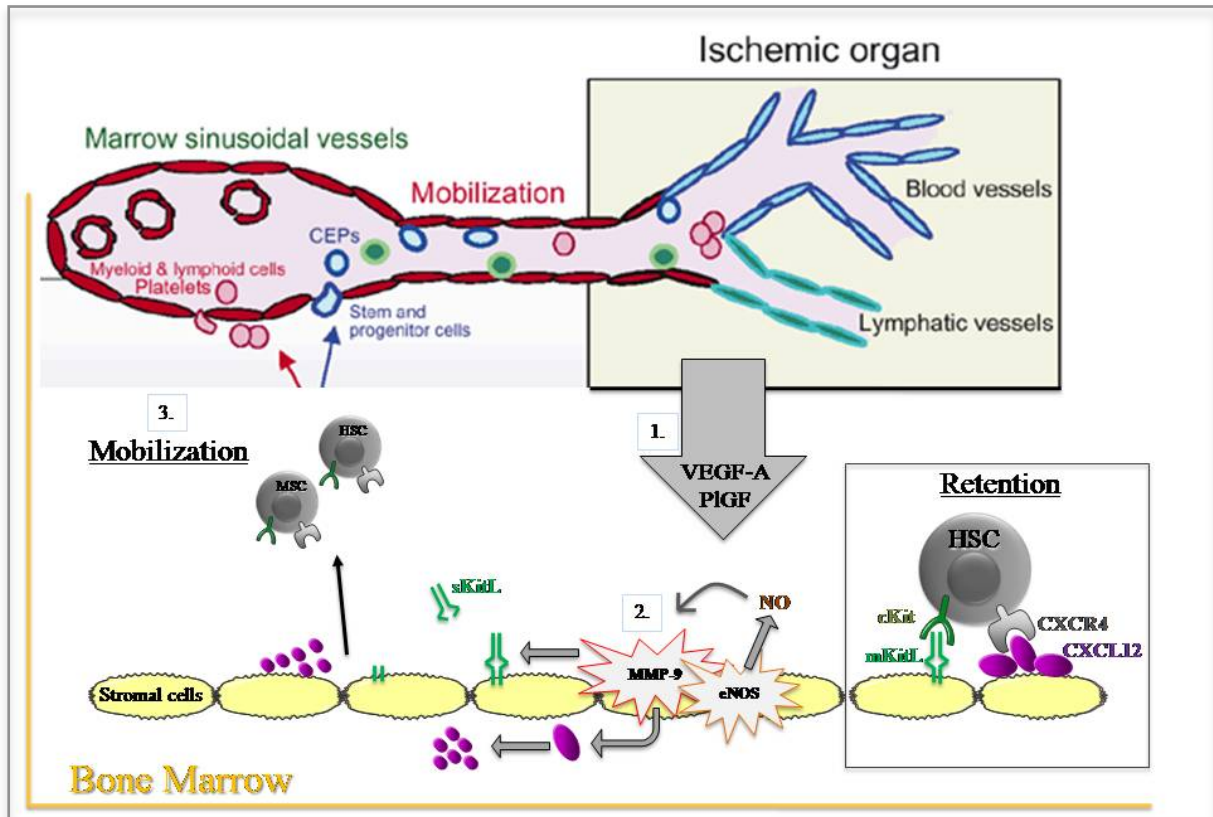


Figure 10: Mécanismes de mobilisation de cellules progénitrices de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. 1. VEGF-A stimule l'activation de MMP-9 et la production de NO au niveau des cellules stromales. 2. MMP-9 clive mKitL et dégrade CXCL12. NO stimule l'activation de MMP-9. 3. Les cellules progénitrices ne sont plus retenues dans la moelle osseuse. *D'après S. Rafii, Nat Med, 2003.*

b. CSF (Colony-Stimulating Factor)

Les CSF (Colony-Stimulating Factors) sont une famille de cytokines capables de moduler la mobilisation et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Il existe plusieurs membres dont le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) et le GM-CSF

(Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor) qui sont connus pour stimuler la différenciation des CSH en monocytes et macrophages. Le GM-CSF stimule également la mobilisation des cellules CD34+CD133+ et des CPE depuis la moelle vers le sang en modulant l'axe CXCL12/CXCR4¹⁰³. En effet, l'injection de G-CSF induit une augmentation du nombre de cellules CXCR4+ circulantes dans le sang, corrélée avec une réduction du taux médullaire de CXCL12. La dégradation de la chimiokine CXCL12 semble essentiellement due à l'activité des élastases produites par les neutrophiles au niveau de la moelle osseuse¹⁰⁴. En effet, des neutrophiles matures sont retenus dans la moelle osseuse par leur interaction CXCR4/CXCL12 et l'activation de ces neutrophiles médullaires par le G-CSF va induire la sécrétion de protéinases (élastases, metalloprotéinases, cathepsines) qui vont cliver les molécules de CXCL12 et permettre la mobilisation non seulement des neutrophiles mais également des CSH CXCR4+.

c. Système neuro-hormonal

La moelle osseuse est innervée par des fibres nerveuses noradrénergiques qui sécrètent des catécholamines. De récentes études suggèrent que les catécholamines du système nerveux sympathique (SNS, ou orthosympathique) régulent la migration des cellules médullaires.

- **Les catécholamines : Dopamine et Norépinephrine**

Les catécholamines sont des hormones ou des neurotransmetteurs synthétisés à partir de la tyrosine, acide aminé qui provient en majorité de notre alimentation ou de la conversion de la phénylalanine. La tyrosine est hydroxylée par la tyrosine hydroxylase (TH) en L-DOPA dont la décarboxylation forme la dopamine (DA). L'hydroxylation de la DA par la dopamine β-hydroxylase (DBH) produit la norépinephrine (NE, ou noradrénaline –NA-).

La dopamine est non seulement une neurohormone produite par l'hypothalamus que l'on retrouve dans le sang, mais également un neurotransmetteur produit par le corps cellulaire des neurones situés dans la substance noire du cerveau. Elle est libérée dans la moelle osseuse au niveau des boutons présynaptiques des neurones noradrénergiques où elle agit en se liant à deux grandes familles de récepteurs : les récepteurs de type D1 et de type D2. Les récepteurs de type D1 (D1R et D5R) sont couplés à la protéine Gs dont l'activation induit une augmentation intracellulaire de l'AMPc qui va activer la protéine kinase A (PKA) et permettre la transcription de nombreux gènes via la phosphorylation du facteur de transcription CREB. Les récepteurs de type D2 (D2R, D3R, D4R) ont au contraire un effet inhibiteur : couplés à la protéine Gi, ils inhibent l'adénylate cyclase, diminuent le taux d'AMPc et limite la transcription génique. De plus, ils diminuent le taux intracellulaire de Ca^{2+} ce qui limite la production de TH et donc la synthèse de catécholamines.

La norépinephrine est un neurotransmetteur spécifique du SNS synthétisé dans les vésicules de transport au niveau du bouton présynaptique. Elle active deux grands types de récepteurs : les récepteurs α (α -1 et α -2) et β (β -1, β -2). Le récepteur α -1 est couplé à la protéine Gq et active d'une part la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC) et induit d'autre part une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} . Ces récepteurs sont connus pour induire la contraction des cellules musculaires lisses et donc une vasoconstriction des vaisseaux. Les récepteurs β ont également un rôle vasoconstricteur avec l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} mais qui passe par l'activation de la voie AMPc/PKA. Enfin, les récepteurs α -2 ont un effet opposé, vasodilatateur, puisque, étant couplés à la protéine Gi, ils inhibent la voie AMPc/PKA et empêchent donc la libération de Ca^{2+} et la transcription génique. De plus, les récepteurs α -2 présents sur l'endothélium stimulent la libération de NO et limitent la vasoconstriction induite par α -1 au niveau des CML.

Si les rôles de la dopamine et de la norépinephrine dans le SNS et les organes périphériques sont assez bien établis, leur effet sur la mobilisation des cellules médullaires mérite encore d'être mieux défini.

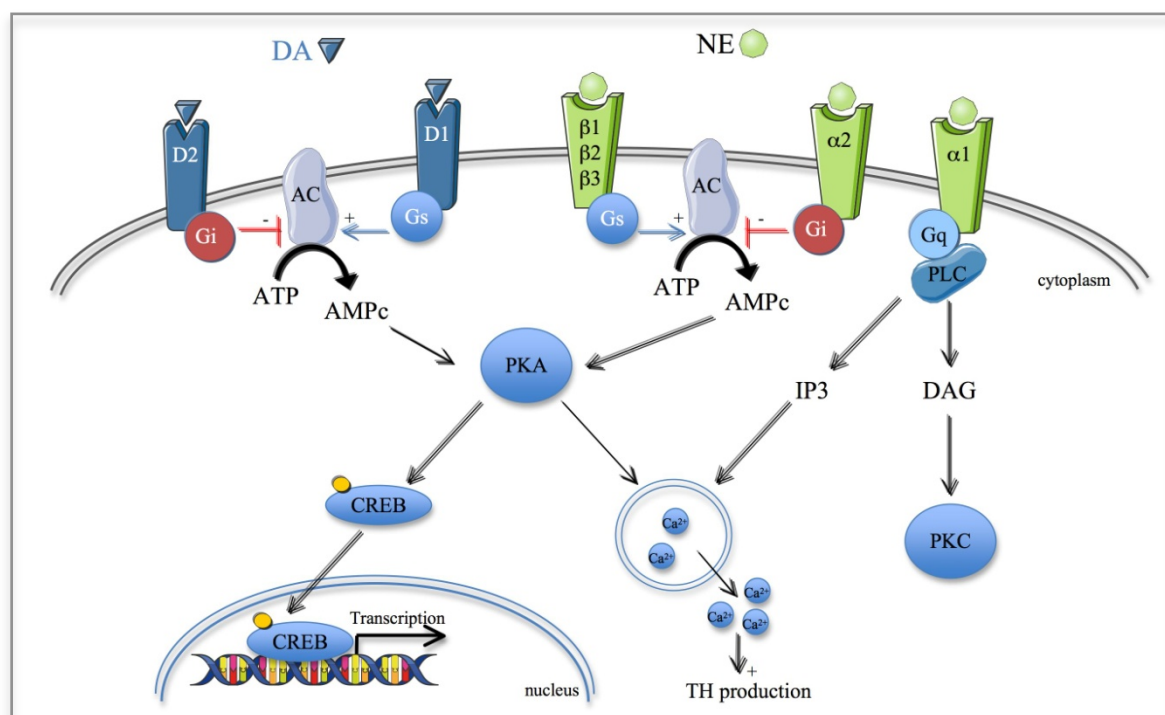


Figure 11: Voies de signalisation de DA et NE.

- Catécholamines et mobilisation des cellules médullaires

L'ablation chimique (6OHDA -neurotoxine pour les neurones dopaminergique et noradrénergique-) ou génétique (souris *Dbh*^{-/-} -déficientes en NE-) de la neurotransmission adrénergique empêche la mobilisation des CSH induite par la stimulation du G-CSF et bloque la dégradation des ostéoblastes et de CXCL12 dans la moelle osseuse. De plus, l'administration d'un agoniste pour le récepteur β2-adrénergique (clenbutérol) rétablit la mobilisation des cellules médullaires chez les souris *Dbh*^{-/-} stimulées par le G-CSF. Ces résultats suggèrent donc que l'effet du G-CSF sur la mobilisation des CSH via la réduction du nombre d'ostéoblastes et de la production de CXCL12 passe par la norépinephrine ¹⁰⁵. La

dopamine joue également un rôle sur la mobilisation des cellules médullaires qui semble dépendre du type de récepteur. Dans un modèle de vascularisation tumorale, il a été montré que l'activation du récepteur D2R par la dopamine bloque la mobilisation des CPE en inhibant la voie de signalisation induite par le VEGF-A et la synthèse de MMP-9 ¹⁰⁶. Au contraire, les cellules CD34+ humaines expriment à leur surface les récepteurs D3R et D5R qui, activées *in vitro* par la dopamine, augmentent leurs capacités de migration, de sécrétion de la MMP-2 et donc de mobilisation ¹⁰⁷. La NE et la DA semblent donc agir de différentes façons sur les cellules médullaires selon le type cellulaire et le récepteur activé.

Dans l'ischémie du membre inférieur, les catécholamines semblent jouer un rôle dans la collatéralisation et l'artériogénèse. En effet, le nombre de leucocytes accumulés dans l'adventice des collatérales diminuent chez les souris Dbh-/- ayant l'artère fémorale ligaturée ¹⁰⁸. L'augmentation de l'expression du récepteur β -2 par injection d'adénovirus au niveau de l'endothélium de l'artère fémorale de rat améliore également la revascularisation post-ischémique de la patte ¹⁰⁹. De plus, des études *in vitro* menées sur les HUVECs ont montré que la NE stimule leur production de NO et de VEGF via leurs récepteurs β -adrénergiques, et stimule leur activité mitogénique via leurs récepteurs α -adrénergiques ¹¹⁰. La DA quand à elle augmente l'activation de la eNOS par le G-CSF grâce à son interaction avec D2R ¹¹¹.

L'ensemble de ces résultats a permis d'établir l'hypothèse du premier article de cette thèse qui met en évidence le rôle des catécholamines dans la régulation de la mobilisation des cellules médullaires via la eNOS dans un modèle murin d'ischémie périphérique.

III. Recrutement des cellules médullaires

Une fois mobilisées, les cellules médullaires parcourent l'ensemble de l'organisme via la circulation sanguine. Plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires permettent de les orienter vers le tissu ischémique et de faciliter leur intégration dans le tissu. L'attraction des cellules vers la zone ischémique se fait essentiellement grâce aux chimiokines, et leur adhésion à l'endothélium grâce aux sélectines et intégrines. Les cellules franchissent ensuite la barrière endothéliale et intègrent le tissu où elles vont interagir avec le microenvironnement.

1. Attraction et activation des cellules médullaires par les chimiokines

a. Qu'est-ce qu'une chimiokine ?

Les chimiokines sont des cytokines de petits poids moléculaires (8 à 14kDa) possédant quatre cystéines et ayant un pouvoir chimioattractant (capacité d'attirer des cellules). Elles sont d'ailleurs essentiellement connues pour leur rôle dans l'attraction des leucocytes vers les sites inflammatoires. Toutefois, d'autres effets directs sur l'angiogenèse, la fibrose, la prolifération et l'apoptose ont été décrits ¹¹². Il existe actuellement chez l'homme environ 50 chimiokines qui sont classées en quatre grandes familles selon la position de leurs cystéines : les XC, CC, CXC, et CX3C. La famille la plus représentée est celle des CC-chimiokines (ou β -chimiokines), nommées ainsi car deux de leurs quatre cystéines sont adjacentes; la plus étudiée d'entre elles étant CCL2 (CCL2). Les CXC-chimiokines (ou α -chimiokines) ont un acide aminé résidu entre leurs deux premières cystéines. Parmi les 17 membres connus de

cette famille, CXCL12 est la chimiokine la plus impliquée dans les processus de revascularisation post-ischémique et le trafic leucocytaire. Les XC-chimiokines n'ont que deux représentants et une seule CX3C-chimiokine est à l'heure actuelle connue, la CX3CL1 (ou Fractalkine) également impliquée dans la régénération vasculaire.

Les chimiokines ont la particularité d'avoir un domaine de liaison aux glycosaminoglycanes qui leur permet d'adhérer à la matrice extracellulaire et de limiter leur dissémination dans la circulation sanguine. Ainsi, elles peuvent être fortement concentrées sur leur lieu de production et former un gradient chimioattractant qui permet d'attirer les cellules vers la zone de plus forte concentration. L'effet des chimiokines sur les cellules passe également par l'activation de leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires, toujours couplés à une protéine G qui stimule une ou plusieurs voies de signalisation intracellulaire. La complexité des interactions chimiokine/récepteur réside dans le fait qu'une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs, et qu'un récepteur peut être activé par différentes chimiokines. En fin, certaines chimiokines sont produites de façon constitutive et régule le trafic basale des cellules mononucléées alors que d'autres sont induites exclusivement dans un contexte pathologique (inflammation, hypoxie...).

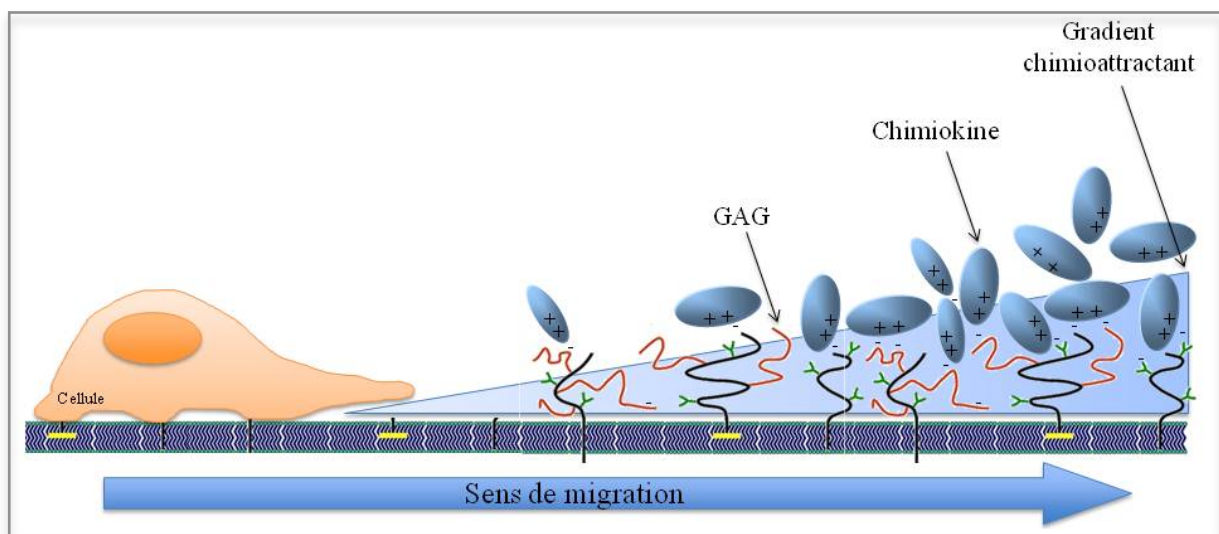


Figure 12: Mode d'attraction des cellules par les chimiokines : chimiotactisme.

b. Les différentes chimiokines participant au recrutement

- **CCL2 (CCL2) / CCR2**

CCL2, couramment nommée CCL2, est l'une des chimiokines les plus impliquées dans les processus de revascularisation post-ischémique. Traiter l'ischémie périphérique induite chez le cochon par infusion intra-artérielle de CCL2 améliore la perfusion sanguine et la collatéralisation du membre ischémique ⁶⁹. Cet effet pro-artériogénique de CCL2 passe par sa capacité à moduler, via son récepteur CCR2, les taux circulants de monocytes qui sont déterminants pour la collatéralisation. En effet, les souris CCR2^{-/-} ayant subi une ligature de l'artère fémorale présentent un défaut de perfusion, un diamètre des collatérales amoindri et un taux de monocytes et de macrophages dans les espaces périvasculaires des artères collatérales diminué. *In vitro*, les cellules mononucléées isolées de souris contrôles migrent vers CCL2 de façon concentration-dépendante, alors que les mononucléées de souris CCR2^{-/-} ne migrent absolument pas ⁶⁸. L'axe CCL2/CCR2 influence d'ailleurs le recrutement dans le tissu ischémique des deux sous-types de monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{lo} ⁷². Il semble aujourd'hui qu'en plus de son rôle dans l'artériogénèse, CCL2 participe également à l'angiogénèse. En effet, les souris CCL2^{-/-} ayant une ischémie induite du membre inférieur présentent une densité capillaire inférieure au souris WT ⁷². Il a également été montré que CCL2 était capable de recruter des cellules progénitrices exprimant CCR2 comme les CSH et les CPE dans un contexte inflammatoire ¹¹³.

L'interaction CCL2/CCR2 influence donc la revascularisation post-ischémique en modulant le recrutement des cellules nécessaires à ce mécanisme, mais également en activant directement les cellules endothéliales sur le site de l'ischémie. *In vitro*, CCL2 a un effet pro-angiogénique direct sur les cellules endothéliales et cellules musculaires lisses, stimulant leur

prolifération, leur migration et leur capacité à former des tubes en matrigel ^{114 115}. Il a également été montré que les HUVECS expriment CCR2 à leur surface et que les expressions de HIF-1 α et de VEGF par ces cellules sont augmentées en présence de CCL2. *In vivo*, l'utilisation d'un inhibiteur de VEGF bloque l'effet pro-angiogénique de CCL2, montrant ainsi que son effet est indirectement induit par VEGF ¹¹⁶.

- CX3CL1 / CX3CR1

CX3CL1, couramment nommée fractalkine (Fkn), est une chimiokine qui a la particularité de posséder un domaine riche en mucines qui lui permet d'adhérer aux cellules endothéliales. Elle est essentiellement connue pour le chimiotactisme qu'elle exerce sur les monocytes/macrophages via son récepteur CX3CR1. Il a d'ailleurs été montré que la voie CX3CL1/CX3CR1 modulait préférentiellement les monocytes Ly6C^{lo} plutôt que les Ly6C^{hi} ⁷². De récentes études suggèrent que la fractalkine est également une chimiokine pro-angiogénique. En effet, les cellules endothéliales expriment le récepteur CX3CR1 et la stimulation *in vitro* de ces cellules par CX3CL1 induit une augmentation de l'expression de HIF-1 α et du VEGF-A ¹¹⁷. *In vivo*, l'expression de CX3CR1 est rapidement augmentée dans le muscle ischémique de rat ayant subi une ligature de l'artère fémorale et l'angiogenèse est améliorée suite à l'injection de CX3CL1 ¹¹⁷. Il a également été proposé que CX3CL1 stimule l'angiogenèse via les voies Raf-1/MEK/ERK et par l'activation de la eNOS au niveau des cellules endothéliales ¹¹⁸.

- CXCL9-10 / CXCR3

Même s'il est moins connu, l'axe CXCL9/CXCR3 a un impact sur la revascularisation tout aussi important que CCL2/CCR2. En effet, les souris CXCR3^{-/-} ayant une ligature de

l'artère fémorale présentent une altération de la revascularisation post-ischémique tout aussi importante que celle observée chez les souris *CCL2^{-/-}*. Les souris *CXCR3^{-/-}* présentent une baisse du nombre de macrophages et de lymphocytes T dans le muscle ischémique ainsi qu'une réduction de l'expression de VEGF. Ceci suggère que CXCR3 induit l'angiogenèse en recrutant des cellules inflammatoires et en stimulant l'expression de VEGF sur le site de l'ischémie ¹¹⁹.

c. CXCL12 (SDF-1)

- **Structure moléculaire**

CXCL12, également nommée SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1) a initialement été découverte en 1994 par l'équipe de Nagasawa dans les cellules stromales de la moelle osseuse où elle est sécrétée de façon constitutive. Ils l'ont tout d'abord caractérisée comme étant un facteur stimulant les lymphocytes B immatures de la moelle osseuse ¹²⁰ puis d'autres équipes ont montré son rôle majeur dans l'organogenèse et dans le trafic des leucocytes à l'âge adulte. La structure de CXCL12 est particulièrement conservée chez les mammifères, un seul acide aminé par exemple diffère le CXCL12 murin de l'humain ¹²¹. Trois isoformes (α , β , γ) et six (α , β , γ , δ , ϵ , θ) résultant d'un épissage alternatif ont été identifiées chez la souris et chez l'homme respectivement ^{122 123}. Ces isoformes sont toutes capables de se lier et d'activer le récepteur CXCR4. Ils ont également un domaine de liaison aux glycosaminoglycanes (GAG), particulièrement aux héparan-sulfates (HS), qui est structurellement bien distinct du domaine de liaison à CXCR4. L'isoforme CXCL12 α , le plus étudié, est composé de 68 acides aminés dont un domaine de liaison aux HS : BBXB (B : acide aminé basique- X : autre acide aminé). Les résidus basiques chargés positivement de ce

domaine permettent l'adhésion par contacts électrostatiques de CXCL12 α aux HS de la matrice extracellulaire chargés négativement. Une mutation dans ce domaine abolie totalement les capacités d'adhésion de CXCL12 α aux HS ¹²⁴. Les deux autres isoformes murins β et γ partagent les trois premiers exons du gène correspondant aux 68 acides aminés de CXCL12 α mais diffèrent de part leur quatrième exon qui code pour une chaîne C-terminale spécifique. Ainsi, CXCL12 β a quatre acides aminés supplémentaires qui forment un domaine de liaison aux HS. De même, CXCL12 γ a 30 acides aminés supplémentaires qui contiennent quatre domaines de liaison aux HS et confèrent à cette isoforme une très forte affinité pour les HS. A titre de comparaison, la constante de dissociation CXCL12 α pour les HS est de 200 nM alors que celle de CXCL12 γ est de 1,5 nM ! Si cette lourde chaîne C-ter affaiblit l'affinité de CXCL12 γ pour CXCR4, elle permet malgré tout un meilleur recrutement *in vitro* des cellules CXCR4+ comme les CHO (Chinese Hamster Ovary) ou les HMVEC (Human MicroVascular Endothelial Cell) ^{125 126}. De plus, la liaison de CXCL12 γ avec les GAG lui confère une meilleure stabilité puisque la demi-vie du complexe CXCL12 γ -GAG est nettement supérieure à celle de CXCL12 α et est drastiquement diminuée lorsque cette chaîne C-ter est mutée ¹²⁵.

CXCL12 est sécrété par les cellules endothéliales, les CPE, les plaquettes et est détectable dans la plupart des tissus. L'expression des différents isoformes semble cependant dépendre de l'organe, du type cellulaire et du stade de développement. En effet, CXCL12 α est exprimé dans la plupart des organes au cours de l'embryogenèse et à l'âge adulte alors que CXCL12 β est pratiquement inexistant au stade embryonnaire et post-natal. CXCL12 β semble essentiellement produit dans le cerveau, la moelle osseuse et le foie. CXCL12 γ est exprimé au cours de l'organogenèse, particulièrement dans la cavité auriculaire. A l'âge adulte, CXCL12 γ est présent de façon constitutive au niveau des veine et artère portes du foie, de l'épithélium

intestinal, des alvéoles pulmonaires, du thymus, du cerveau, de l'oreillette et du ventricule cardiaque ¹²⁷. CXCL12 α et γ semblent être particulièrement sécrétés au niveau de la moelle osseuse. En fin, l'expression de ces isoformes peut également être induite dans certains tissus uniquement dans des conditions pathologiques comme l'inflammation ou l'hypoxie.

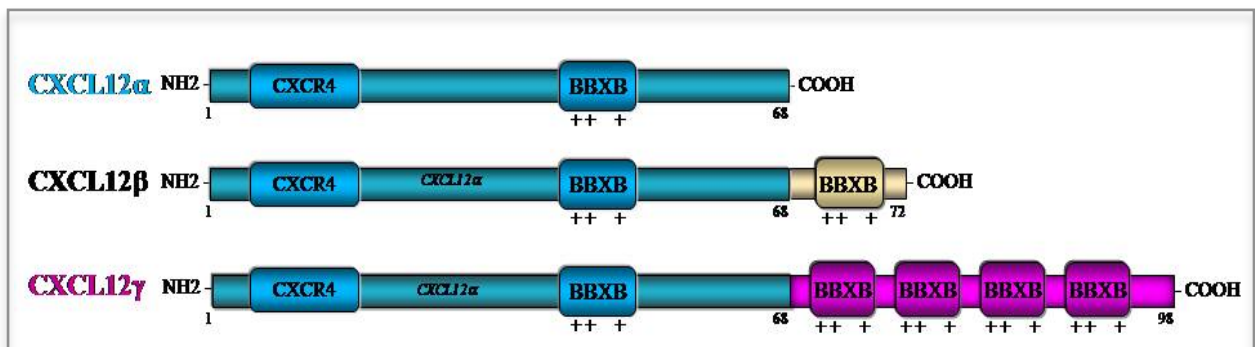


Figure 13: Structure moléculaire des différents isoformes murins de CXCL12.

- **Mode d'action - chimiotactisme**

L'attraction qu'exerce CXCL12 sur les cellules CXCR4⁺ dépend essentiellement de son gradient de concentration, les cellules migrant vers les zones les plus concentrées. La mobilisation des cellules depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine puis leur recrutement dans le tissu dépend donc du gradient de concentration de CXCL12 qui existe entre ces trois compartiments. Dans des conditions physiologiques, CXCL12 est fortement et constitutivement exprimé dans la moelle osseuse par les cellules stromales et est pratiquement absent dans le sang, ce qui permet la retenue des cellules CXCR4⁺ dans la moelle. Lors d'une ischémie, un ensemble de mécanismes induit la dégradation de CXCL12 dans la moelle osseuse (cf chapitre II. 2. a.) et l'hypoxie stimule via le facteur de transcription HIF-1 α l'expression de CXCL12 dans le tissu ischémique (cf chapitre I. 3. a.) ¹²⁸. Ainsi, la dégradation de CXCL12 dans la moelle osseuse et l'augmentation de son expression au

niveau du tissu lésé inverse son gradient de concentration et permet d'attirer les cellules médullaires CXCR4⁺ depuis la moelle, vers la zone hypoxique. Les cellules mononuclées, les cellules NK, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les CSH ou encore les CPE expriment CXCR4 à leur surface et font donc partie des nombreuses cellules attirées puis recrutées sur le site de l'ischémie grâce à CXCL12.

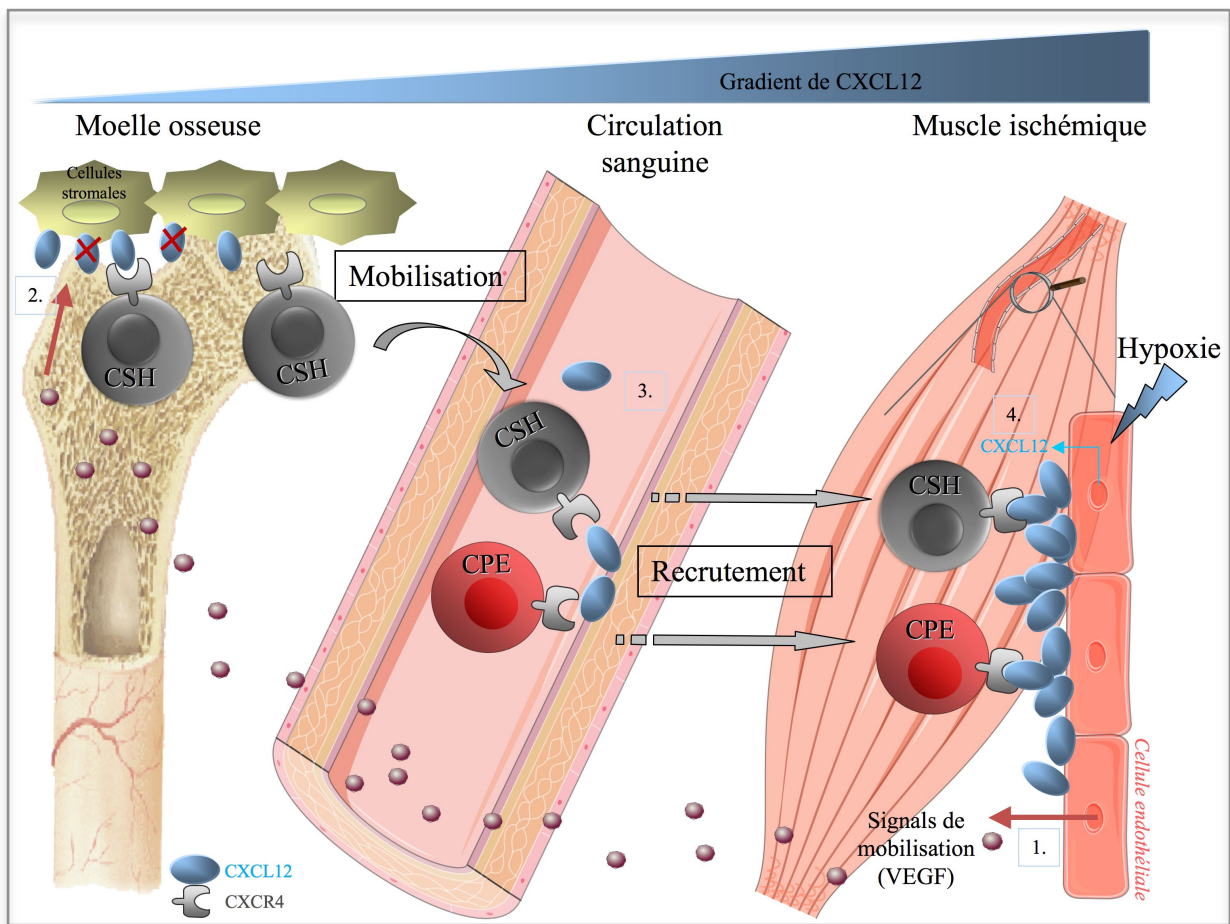


Figure 14: Recrutement des cellules médullaires dans le tissu ischémique grâce au gradient chimioattractant de CXCL12. 1. L'hypoxie induit la synthèse de molécules de signalisation et de CXCL12. 2. Dégradation de CXCL12 au niveau médullaire : inversion du gradient CXCL12. 3. Mobilisation des cellules CXCR4⁺ depuis la moelle vers le sang. 4. Recrutement des cellules CXCR4⁺ dans le tissu ischémique via CXCL12. CSH. (Cellule Souche Hématopoïétiques CPE :Cellule Progénitrice Endothéliale).

- **CXCL12/CXCR4 et revascularisation post-ischémique**

L'augmentation de l'expression de CXCL12 par thérapie génique dans la patte ischémique de souris ayant subi une ligature de l'artère fémorale améliore la perfusion sanguine du membre. En effet, la surexpression de CXCL12 augmente les taux circulants de CPE, leur incorporation dans les vaisseaux néoformés et la production de NO dans le muscle ischémique. L'inhibition de VEGF ou de la eNOS bloque l'effet induit par CXCL12, montrant ainsi que l'effet pro-angiogénique de cette chimiokine dépend de VEGF et de la eNOS ¹²⁹. Étonnamment, injecter un antagoniste de CXCR4 (AMD3100) à des souris présentant une ischémie périphérique permet une revascularisation plus rapide du membre. En fait, l'AMD3100 bloque l'interaction CXCR4/CXCL12 dans la moelle osseuse et permet une mobilisation forte et rapide des cellules médullaires mononuclées dans le sang qui, par leur effet paracrine, vont stimuler la revascularisation post-ischémique ¹³⁰. En plus de favoriser la mobilisation et le recrutement des cellules médullaires, CXCL12 agit également directement sur les cellules et potentialise leur effet pro-angiogénique. En effet, il a été montré que prétraiter des CPE avec du CXCL12 potentialise leurs capacités à migrer, à se différencier et à former de tubes *in vitro*. Les CPE prétraitées avec CXCL12 et injectées dans des souris nudes ayant une ligature de l'artère fémorale induisent d'ailleurs une meilleure revascularisation post-ischémique par rapport à des CPE non traitées. Ces effets sont abolis en présence d'AMD3100 montrant ainsi que l'axe CXCL12/CXCR4 potentialise le phénotype pro-angiogénique des CPE ¹³¹.

La plupart des études faites sur CXCL12 font l'amalgame entre les trois isoformes ou ne s'intéressent qu'à CXCL12 α . Pourtant, de part leurs différences structurales, ces isoformes présentent *in vitro* des capacités d'adhésion aux GAG et à CXCR4 différentes et il n'est pas aberrant d'imaginer que cela puisse moduler leurs effets *in vivo*. Il a d'ailleurs été montré que l'injection de CXCL12 γ dans la cavité péritonéale de souris permet de recruter

d'avantage de lymphocytes T, de lymphocytes B et de neutrophiles par rapport à CXCL12 α . Des travaux fait *ex vivo* à l'aide de plugs en matrigel montrent également que CXCL12 γ permet une meilleure formation de structures vasculaires que CXCL12 α ¹²⁶. Cette différence d'efficacité observée entre CXCL12 γ et CXCL12 α semble essentiellement dépendre de l'incroyable capacité de liaison de CXCL12 γ aux HS puisque des mutations dans sa chaîne C-terminale abolissent ces effets.

L'hypothèse selon laquelle les interactions entre les protéoglycanes et CXCL12 régulent les fonctions homéostatique et physiopathologique de cette chimiokine dans la revascularisation post-ischémique du membre inférieur, a permis d'élaborer le deuxième article de cette thèse.

d. Activation de la cellule médullaire: interaction CXCL12/CXCR4

L'interaction entre CXCL12 et CXCR4 induit un changement conformationnel du ligand et du récepteur qui renforce leur liaison et permet l'activation de la protéine G_i couplée à CXCR4. Certains papiers montrent que CXCR4 peut également s'homodimériser, ce qui accentue la réponse de CXCR4 à CXCL12 ¹³². La protéine G_i active ensuite de nombreuses voies de signalisation telles que celles de la phospholipase C- β (PLC- β), des MAP kinases (MAPK – mitogen activated protein kinase) ou de la phosphoinositide-3 kinase (PI₃K) qui vont moduler des nombreux processus comme la migration, l'adhésion ou encore la survie cellulaire ¹³³. L'activation de la PLC par les protéines G permet la libération d'inositol triphosphate (IP₃) et donc l'augmentation intracellulaire de Ca²⁺ qui module, entre autre, le

réseau d'actine de la cellule et donc la migration cellulaire. La voie des MAPKs et de PI3K augmente quand à elle la survie et la prolifération cellulaire. La transcription génique est également induite suite à l'interaction CXCR4/CXCL12, permettant notamment la production de VEGF et de NO. En se liant à CXCR4, CXCL12 potentialise donc l'effet des cellules médullaires recrutées sur le site de l'ischémie.

Il a récemment été montré que CXCL12 interagissait également avec le récepteur CXCR7 dont le rôle reste encore très mal déterminé ¹³⁴. CXCR7 ne semble pas activer de voie de signalisation intracellulaire puisque ce récepteur n'est pas couplé à une protéine G et que son activation *in vitro* par CXCL12 ne stimule ni une migration cellulaire ni une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} ¹³⁴. Certaines études montrent que CXCR7 agit comme un corécepteur de CXCR4 avec qui il s'hétérodimérise sous l'action de CXCL12, et inhibe la voie de signalisation protéine G-dépendante de CXCR4 ^{135 136}. Cependant, d'autres travaux ont montré que CXCR7 a également un rôle indépendant de CXCR4 sur la survie des cellules ^{134 137}. En bloquant *in vitro* CXCR4 ou CXCR7, il a été permis de comprendre que seul CXCR4 permet de réguler la migration de cellules progénitrices rénales, que leur migration transendothéliale nécessite la présence des deux récepteurs, et que seul CXCR7 est responsable de la survie cellulaire induite par CXCL12 ¹³⁷. Enfin, CXCR7 semble également jouer un rôle dans l'internalisation et la dégradation de CXCL12 via la β -arrestine ¹³⁸.

CXCL12 permet donc non seulement d'attirer les cellules CXCR4+ vers le tissu ischémique mais également de stimuler leur prolifération, leur survie et leur migration.

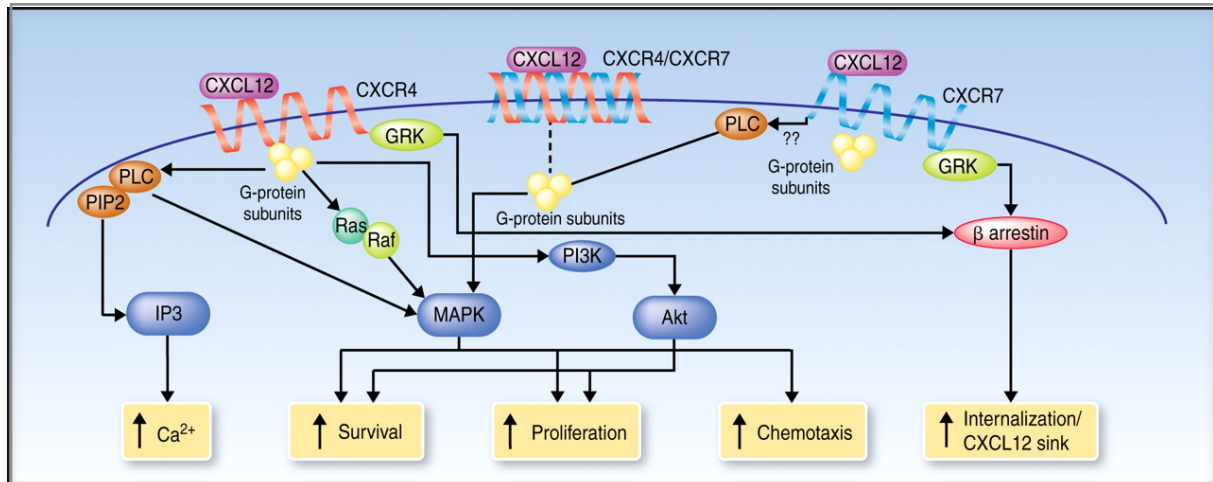


Figure 15: Voies de signalisations intracellulaires induites par l'interaction CXCL12/CXCR4.

D'après Rakesh K. Jain, Clin Cancer Res, 2011

2. Roulement, arrêt et transmigration des cellules dans le tissu ischémique

Les cellules médullaires attirées sur le site de l'ischémie via les chimiokines roulent sur l'endothélium puis y adhèrent selon des interactions ligand/récepteur. Ces cellules pénètrent ensuite dans le tissu ischémique par transmigration endothéliale. Ce mécanisme de roulement, d'adhésion et de transmigration est appelé « diapedèse ».

a. Roulement des cellules grâce aux sélectines

Les sélectines sont une famille des glycoprotéines à un seul domaine transmembranaire dont il existe trois membres : la L-sélectine (leucocytaire), la E-sélectine (endothéliale) et la P-sélectine (plaquettaire). Les E et P-sélectines sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et forment de faibles liaisons avec le PSGL-1 présent sur les

cellules médullaires. Ces interactions faibles et provisoires permettent aux cellules médullaires de « rouler » le long de l'endothélium et de ralentir leur progression. Six heures seulement après la ligature de l'artère fémorale, l'expression de la P et de la E-sélectine sont augmentées dans le muscle ischémique de souris WT, montrant ainsi que les sélectines jouent un rôle dès la phase aigüe de l'ischémie. De plus, il a été montré que traiter des CPE avec de l'ephrin-B2 augmente non seulement leur potentiel paracrine mais également leur expression de PSGL-1 à leur surface. Ces CPE prétraitées à l'ephrin-B2 potentialisent d'ailleurs leur effet pro-angiogénique dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur en améliorant leurs capacités d'adhésion et d'incorporation au tissu ¹³⁹.

La E-selectine est également présente à la surface des CPE. Le recrutement des CPE est fortement altéré chez les souris E-sélectine^{-/-} mais restauré par l'injection d'E-selectine soluble (sE-sélectine). En effet, la sE-sélectine active le PSGL-1 présent sur les CPE et stimule l'expression d'intégrines telle que ICAM-1, permettant ainsi leur adhésion et leur recrutement dans le tissu lésé ¹⁴⁰.

b. Arrêt des cellules grâce aux intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires constituées de deux sous-unités α et β qui sont connues pour leur rôle dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Certaines intégrines peuvent également se lier à des ligands cellulaires et permettre ainsi des interactions intercellulaires. Les leucocytes, les lymphocytes ou encore les progéniteurs endothéliaux expriment ce type d'intégrines ($\alpha_L\beta_2$ –LFA-1-, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_V\beta_3$) et peuvent donc se lier aux récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales (ICAM-1, VCAM-1). Ces liaisons étant fortes et stables, elles permettent aux cellules médullaires d'adhérer et de s'arrêter à l'endothélium. Dans un modèle murin, la ligature de l'artère fémorale induit une

élévation de l'expression d'ICAM-1 dans le muscle ischémique. Cette augmentation est également observée *in vitro* lorsque des cellules endothéliales murines sont soumises à des conditions hypoxiques. L'inhibition d'ICAM-1 réduit d'ailleurs considérablement le recrutement des CPE dans le muscle lésé et la revascularisation post-ischémique ¹⁴¹. L'inhibition de l'intégrine- β 2 (CD18) par un anticorps réduit également de plus de 90% le recrutement des CPE dans le myocarde ischémique de souris ¹⁴². Dans un modèle d'ischémie périphérique, les souris CD18^{-/-} présentent un défaut de revascularisation post-ischémique dû à une altération du recrutement des cellules progénitrices Sca-1⁺/Lin-1⁻ ¹⁴³. En fin, il a été montré *in vitro* que l'utilisation d'un anti-CD18 inhibe l'adhérence des CPE et des leucocytes aux HUVECs et bloque la migration transendothéliale des CPE vers CXCL12 ou VEGF ^{142 143}. Ainsi, le couple intégrine- β 2/ICAM-1 joue un rôle crucial pour le recrutement des cellules médullaires dans le muscle ischémique et leur transmigration dans le tissu.

c. Transmigration endothéliale

Les cellules médullaires qui ont adhéré aux cellules endothéliales franchissent ensuite l'endothélium selon deux mécanismes distincts : soit en pénétrant entre deux cellules endothéliales (transmigration paracellulaire), soit en traversant une cellule endothéliale (transmigration transcellulaire). Ce paragraphe traite de la transmigration paracellulaire, mécanisme le plus étudié dans l'angiogenèse.

Les jonctions entre les cellules endothéliales sont dépendantes de nombreuses molécules d'adhésion telles que PECAM-1, CD99 ou JAM-A. PECAM-1, également nommée CD31, est la molécule d'adhésion la plus étudiée dans les processus de perméabilité vasculaire et donc de transmigration paracellulaire ¹⁴⁴. Les souris CD31^{-/-} ont d'ailleurs permis

de montrer que cette molécule n'influence pas le développement vasculaire ni la migration des leucocytes mais joue spécifiquement sur la transmigration des cellules à travers l'endothélium ¹⁴⁵. Il a de plus été montré qu'injecter des anticorps anti-CD31 en intraveineux chez des rats ayant subi une ischémie/reperfusion du membre inférieur inhibe l'infiltrat inflammatoire dans le muscle lésé ¹⁴⁶.

L'adhésion des cellules médullaires sur l'endothélium stimule également la production de NO par les cellules endothéliales. Le NO étant un puissant vasodilatateur, cela augmente la vasodilatation et la perméabilité du vaisseau, favorisant ainsi la transmigration paracellulaire.

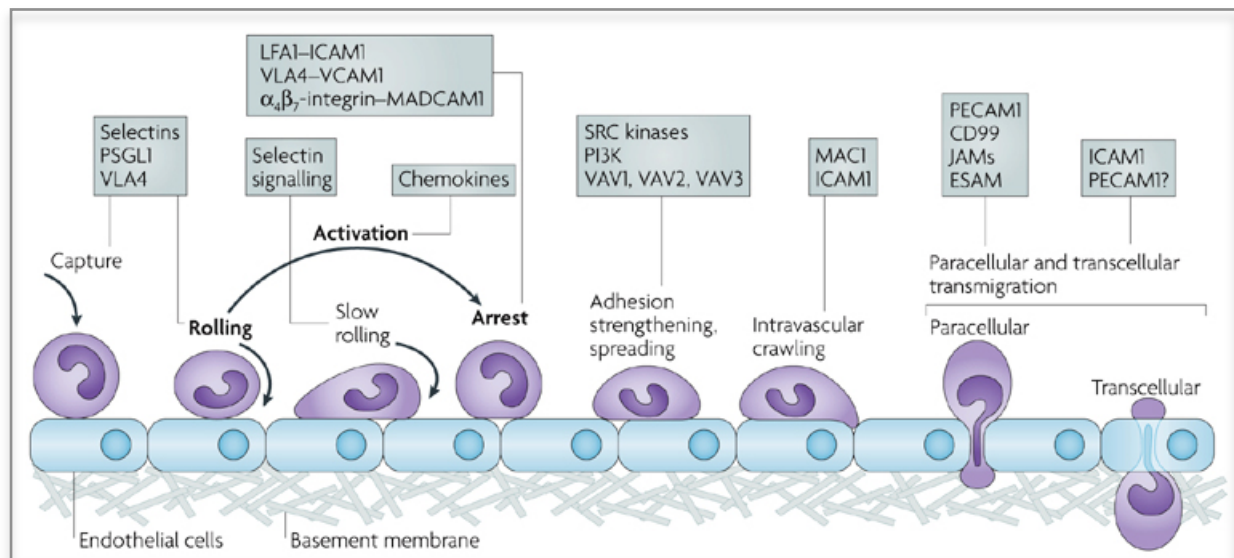


Figure 16: Etapes successives et interactions moléculaires permettant la diapédèse.

D'après Klaus Ley, Nature Reviews Immunology, 2007

3. Devenir des cellules dans le tissu ischémique

Les cellules médullaires recrutées au niveau du tissu ischémique modulent la revascularisation selon trois principaux mécanismes : elles sont capables de se différencier en cellules vasculaires matures pour intégrer le vaisseau néoformé, de sécréter des facteurs pro-

angiogéniques et/ou d'interagir avec les cellules hôtes. A l'heure actuelle il est encore difficile de déterminer précisément le devenir de chaque cellule inflammatoire ou progénitrice, mais il est fort probable que ces trois mécanismes concourent ensemble afin de promouvoir la revascularisation post-ischémique.

a. Différenciation et intégration des cellules

De nombreuses études ont montré la capacité des cellules médullaires à se différencier en cellules vasculaires. En effet, les CPE isolées du sang périphérique humain expriment après quelques jours de culture *in vitro* des marqueurs de cellules endothéliales matures (CD31, VEGFR2)⁸⁷. Ces progéniteurs endothéliaux sont également capables d'intégrer les vaisseaux néoformés. Des études *in vitro* réalisées à l'aide de matrigel ont montré que les CPE précoces et tardives mises en présence d'HUVEC étaient capables d'induire la formation d'un réseau vasculaire. Toutefois, les CPE tardives mises en culture seules sont capables de participer de manière constitutive à la formation de tubes en matrigel, alors que les CPE précoces ne le sont pas. Ces deux types de progéniteurs endothéliaux présentent donc des modes d'action différents¹⁴⁷. *In vivo*, lorsque des CPE humaines sont injectées en intraveineux dans des souris ayant une ischémie du membre inférieur, certaines sont retrouvées incorporées aux capillaires néoformés du muscle ischémique et expriment le marqueur endothélial CD31^{87 96}. D'autres cellules médullaires comme les CSH cKit+Sca-1+ sont également capables d'intégrer l'endothélium vasculaire et d'exprimer des marqueurs de cellules endothéliales matures comme le CD31 et le facteur de von Willebrand¹⁴⁸. De plus, des cellules mononuclées originaires de la moelle osseuse (BM-MNC) injectées dans la zone infarctée du myocarde intègrent 30% des capillaires néoformés montrant ainsi que les BM-

MNC sont également capables de se différencier en cellule endothéliale ¹⁴⁹. Les cellules médullaires peuvent également se différencier en d'autres types cellulaires, comme les CSH qui évoluent *in vitro* et *in vivo* en cellules musculaires lisses.

De nombreux papiers montrent que ces cellules médullaires sont capables d'intégrer les vaisseaux et de présenter des marqueurs de cellules vasculaires matures. Cependant, leur réelle différenciation et fonctionnalité restent encore débattues. En effet, les travaux menés par l'équipe de Schaper ont montré grâce à la précision de la microscopie confocale qu'elles n'incorporent pas réellement les vaisseaux formés suite à une ischémie périphérique mais qu'elles s'accumulent autour des collatérales. Ces cellules ont d'ailleurs été identifiées comme étant des fibroblastes, des péricytes et des leucocytes soutenant l'idée que les cellules médullaires sont capables de se différencier, mais auraient plutôt un rôle de cellules de soutien ¹⁵⁰. De plus, l'hypothèse que les CPE ne deviennent pas de parfaites cellules endothéliales matures mais qu'elles miment une activité de type cellule endothéliale a également été soulevée ; ce phénomène de mimétisme vasculogénique ayant déjà été observé dans la croissance tumorale rapide ¹⁵¹. L'incorporation des cellules progénitrices dans les vaisseaux néoformés est donc toujours actuellement débattue et les résultats varient selon le modèle expérimental, le type cellulaire ou encore le mode d'administration des cellules. Toutefois, il reste évident que ces cellules médullaires intègrent le tissu ischémique puisqu'on les retrouve plusieurs jours à plusieurs semaines après leur administration, et qu'elles potentialisent la revascularisation post-ischémique.

b. Effet paracrine

De nombreuses études montrent que l'effet pro-angiogénique des cellules progénitrices médullaires serait dû aux nombreux facteurs qu'elles sécrètent. En effet, même

si les BM-MNC ne contiennent que 0,01% de progéniteurs, l'injection de celles-ci augmente considérablement la collatéralisation, suggérant d'autres mécanismes que l'intégration des cellules souches dans les vaisseaux. Diverses études ont montré que les BM-MNC sécrètent *in vitro* et *in vivo* des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, FGF, CCL2 ou le TNF- α ¹⁴⁹. Le surnageant de ces cellules isolées à partir de la moelle de patients ayant un infarctus du myocarde stimulent d'ailleurs la prolifération, la migration et la formation de tubes en matrigel des cellules endothéliales coronaires humaines ¹⁵². Les CSM, sont également d'importantes sources de cytokines et sécrètent *in vitro* du VEGF, bFGF, PlGF et CCL2. L'utilisation seule du surnageant de ces cellules active la prolifération *in vitro* des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. *In vivo*, l'amélioration de la revascularisation observée chez la souris ayant une ligature de l'artère fémorale suite à l'injection de CSM est corrélée à une augmentation des taux de VEGF et de bFGF dans la patte ischémique, révélant le rôle crucial des facteurs sécrétés par les CSM ⁸⁴. Enfin, il a été montré que les CPE tardives forment plus facilement des tubes *in vitro* que les CPE précoces, pourtant ces deux sous-groupes présentent *in vivo* des capacités vasculogéniques similaires. Ceci peut s'expliquer par le fait que les CPE précoces ont un pouvoir paracrine supérieur aux CPE tardives et sécrètent *in vitro* d'avantage de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et l'IL-8 ¹⁴⁷.

Les cellules inflammatoires ont également un effet paracrine. En effet, il a été montré que les lymphocytes T sécrètent du VEGF et jouent un rôle central dans la coordination de la réponse cellulaire face à une occlusion artérielle en modulant le recrutement des monocytes/macrophages (stable E, burnett MS, cir 2003,108 :205-210). Les monocytes produisent également de nombreuses cytokines comme le VEGF, NO, CCL2 et bFGF ^{153 154}

c. Interaction avec le tissu hôte

Les cellules progénitrices et inflammatoires arrivant sur le site de l'ischémie sécrètent de nombreux facteurs qui modulent leur microenvironnement. Elles libèrent notamment des facteurs mitogéniques comme le VEGF, le FGF ou le PlGF qui stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales et musculaires lisses endogènes qui sont les principaux constituants des vaisseaux néoformés. Ainsi, lorsque des CPE humaines sont injectées dans le myocarde ischémique d'une souris, la production de cytokines humaines dans le cœur décroît au bout d'une semaine alors que celle des cytokines murines se maintient. La présence des CPE augmente également les taux circulants de BM-MNC et leur incorporation dans le tissu ischémique montrant ainsi que les CPE favorisent le recrutement d'autres cellules progénitrices ¹⁵⁵. Cela résulte du fait que les CPE, mais également les lymphocytes T et monocytes, sécrètent des chimiokines comme CXCL12. Les CPE libèrent également du NO qui accentue la perméabilité vasculaire et facilite l'extravasation des cellules sanguines. Enfin, la sécrétion de protéases comme les métalloprotéinases par les cellules médullaires favorise la migration des cellules endogènes et donc la formation des vaisseaux.

Les facteurs sécrétés par les cellules médullaires favorisent également la régénération tissulaire en activant la différenciation de progéniteurs endogènes non vasculaires. Une étude récente a d'ailleurs montré que l'injection intracardiaque de cellules médullaires cKit⁺ chez des souris ayant un infarctus du myocarde stimule la différenciation des progéniteurs endogènes en cardiomyocytes ¹⁵⁶.

Les cellules médullaires modulent donc leur microenvironnement mais l'environnement module également leur activité. En effet, de la même façon que les cellules endogènes, elles sont exposées à l'hypoxie, aux forces de cisaillements et au cocktail de cytokines qui stimulent leurs capacités pro-angiogéniques. Cependant, ce milieu particulier

riche en réactifs de l'oxygène, débris apoptotiques et facteurs inflammatoires peut également être délétère et a tendance à amoindrir l'efficacité des cellules souches/progénitrices

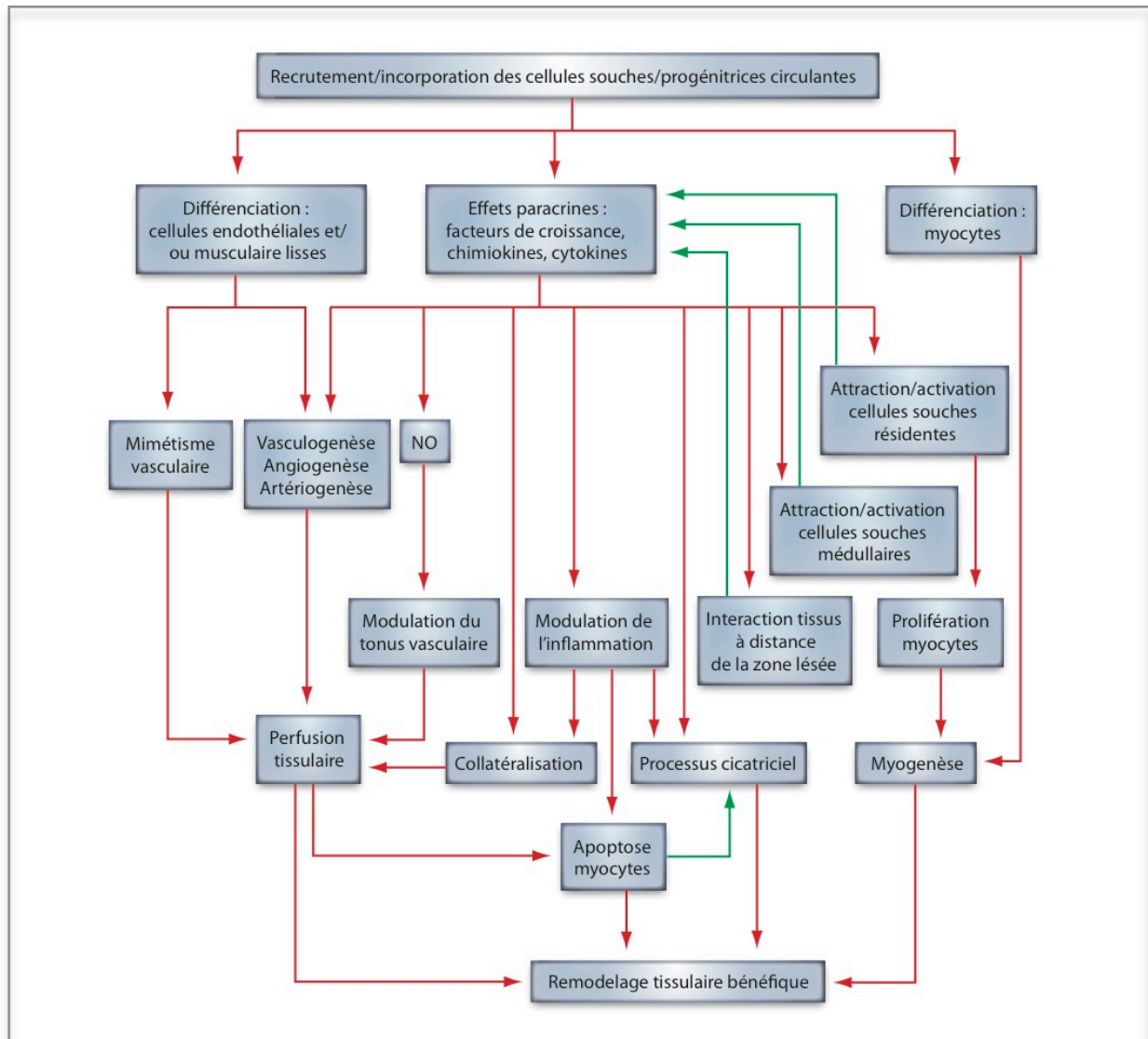


Figure 17: Mécanismes moléculaires et cellulaires

D'après JS. Silvestre, B. Lévy et D. Smadja, 2012

IV. La thérapie cellulaire : nouveau traitement contre les pathologies ischémiques ?

Les maladies ischémiques périphériques n'ont pas seulement un impact majeur sur la qualité de vie des patients, elles augmentent également leurs risques d'évènements cardiovasculaires fatals. Malgré les traitements et techniques chirurgicales actuels, les risques d'amputation et les chances de survie restent un problème majeur pour un grand nombre de patients qui ne sont pas éligibles à ces procédures de revascularisation. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pharmacologique efficace pour traiter cette pathologie, révélant le besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Historiquement, les premières stratégies de revascularisation post-ischémique ont été basées sur l'administration de facteurs de croissance sous forme protéique ou à l'aide de plasmides ou d'adénovirus. Si l'efficacité de ces traitements a largement été démontrée dans les modèles murins, les résultats des essais cliniques menés sur des patients ayant une artérite oblitérante des membres inférieurs (AOMI) restent décevants. En effet, la première étude randomisée menée en phase II et basée sur l'administration en intramusculaire d'adénovirus contenant du VEGF₁₂₁ chez 105 patients ayant une AOMI n'a pas montré d'amélioration du temps de marche par rapport à l'administration d'un placebo (RAVE, 2003). Le plus grand essai clinique de phase II mené à ce jour pour traiter les ischémies périphériques est l'étude TALISMAN 201 basée sur une quadruple administration intramusculaire de plasmides contenant du FGF1 à 125 patients présentant une ischémie critique des membres inférieurs. Si ce traitement n'a pas montré d'amélioration du temps de marche ni de la cicatrisation des ulcères, il a montré une diminution significative du taux

d'amputations à un an et des décès. Ces résultats très encourageants ont permis de lancer la phase III (TAMARIS) de cet essai clinique mené sur plus de 500 patients et à l'échelle mondiale. Malheureusement, l'étude TAMARIS n'a pas confirmé l'effet bénéfique de la thérapie génique observée en phase II, et a été abandonnée. Si ces traitements géniques présentent relativement peu d'effets secondaires et sont techniquement assez aisés à réaliser, ils sont insuffisants pour induire de réels effets bénéfiques pour les pathologies ischémiques périphériques. Une autre stratégie thérapeutique très prometteuse est celle basée sur l'administration de cellules souches ou progénitrices, d'origine diverses.

1. Quelles cellules pour quel traitement ?

Les cellules souches ont des capacités d'auto-renouvellement, de prolifération, de différenciation et une activité paracrine remarquables qui font d'elles un excellent candidat pour promouvoir la revascularisation post-ischémique. De nombreuses études faites sur l'animal ont montré l'efficacité de la thérapie cellulaire pour traiter l'ischémie périphérique et de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours chez l'homme. Toutefois, de part la diversité des types de cellules souches, de leur origine, de leur degré de différenciation et de leurs mécanismes d'action, l'efficacité de la thérapie cellulaire reste à l'heure actuelle très variable et la validation clinique toujours incertaine.

a. BM-MNC et PB-MNC

Les cellules mononuclées de la moelle osseuse (BM-MNC) ou du sang périphérique (PB-MNC) sont des populations hétérogènes constituées de cellules matures et progénitrices isolées à partir des marqueurs CD34+ et CD133+. Prélevées directement dans la moelle

osseuse des patients, les BM-MNC sont composées d'une grande majorité de cellules mononuclées (lymphocytes -69%-, érythroblastes -8%-, granulocytes -15%-, monocytes -8%-) et d'une minorité de progéniteurs (0,01%)¹⁵⁷.

La première utilisation des BM-MNC comme produit de thérapie cellulaire chez l'homme pour traiter l'ischémie périphérique critique a été réalisée par une équipe japonaise en 2002 et a montré des résultats très favorables. Dans cette étude, 25 patients présentant une ischémie critique unilatérale avec présence de gangrène ou d'ulcère pour 14 d'entre eux, ont reçues 10⁹ BM-MNC autologues en quarante injections intramusculaires. Quatre semaines plus tard, la douleur au repos, le temps de marche sans douleur et l'ankle-brachial index (ABI) ont été améliorés ; huit semaines après, l'étendue des ulcères était considérablement diminuée et vingt-quatre semaines après le traitement, les angiographies faites sur les jambes ischémiques révélaient un développement net des collatérales¹⁵⁷. Cette première étude pilote réalisée chez l'homme, a également permis de comparer l'efficacité des PB-MNC par rapport à celle des BM-MNC grâce à 22 patients présentant une ischémie bilatérale. Chaque patient a reçu en double aveugle et de façon randomisée des BM-MNC dans une jambe et des PB-MNC dans l'autre. Les jambes ayant reçu les BM-MNC ont vu tous les critères cliniques s'améliorer alors qu'aucun effet bénéfique n'a été observé suite à l'injection de PB-MNC¹⁵⁷. Depuis, une cinquantaine d'études essentiellement de phase I et II se sont intéressées à l'utilisation des BM-MNC pour traiter les patients atteints d'AOMI, d'ischémie critique ou de la maladie de Buerger et ont montré des résultats positifs^{158 159 160}.

Cependant il reste encore à définir un protocole précis d'utilisation de cette thérapie cellulaire. En effet, la technique de prélèvement de la moelle, le tri et la mise en culture des cellules, le nombre de BM-MNC administrés, la répétition des injections ou encore le mode d'administration des cellules sont autant de facteurs qui modulent l'efficacité du traitement. Par exemple, dans la grande majorité des études cliniques, les cellules ont été injectées en

intramusculaire alors que l'étude allemande PROVASA a récemment montré qu'une injection intra-artérielle était également bénéfique pour la cicatrisation des ulcères et pour la douleur au repos ressentie par les patients. Elle a également montré qu'une deuxième injection de BM-MNC trois mois après la première potentialise la cicatrisation et l'ABI ^{158 161}. Le nombre de cellules progénitrices injectées détermine également l'efficacité du traitement. En effet, dans l'étude menée par Tateishi-Yuyama, les PB-MNC n'ont pas induit l'effet bénéfique obtenu avec les BM-MNC, mais les PB-MNC contenaient 500 fois moins de cellules CD34+ que les BM-MNC ¹⁵⁷. D'autres travaux utilisant des stimulants de la mobilisation des cellules médullaires (G-CSF) et différentes méthodes d'isolation des PB-MNC afin d'augmenter leur nombre ont d'ailleurs montré une amélioration de la cicatrisation des ulcères et de la douleur au repos grâce à ces PB-MNC ¹⁶².

Même si ces résultats ne sont pas encore suffisants pour en faire un traitement courant contre les AOMI, ils représentent un grand espoir thérapeutique pour les patients ne pouvant pas avoir recours aux procédures classiques de revascularisation. Une étude clinique en phase III et à très grande échelle est donc nécessaire pour confirmer l'efficacité des BM-MNC et déterminer d'éventuels effets secondaires. En effet, la plupart des études n'ont été réalisées que sur quelques mois et avec un nombre relativement limité de patients. Une équipe japonaise s'est intéressée à l'effet de l'administration de BM-MNC sur le long terme et a relevé que quatre de leurs huit patients ont présenté de graves complications cliniques comme la mort subite, la régression de l'angiogenèse ou l'aggravation de la douleur dans les deux années suivant l'injection de BM-MNC ¹⁶³.

La population hétérogène des BM-MNC contient des cellules souches mésenchymateuses et des progéniteurs endothéliaux connus pour avoir un fort potentiel pro-angiogénique. Certaines études soutiennent donc l'idée qu'utiliser une population plus homogène de progéniteurs serait plus efficace pour traiter l'ischémie périphérique.

b. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) étant capables de se différencier en cellules vasculaires et musculaires, et ayant un fort pouvoir paracrine, elles représentent un grand espoir thérapeutique pour la régénération vasculaire et tissulaire. Initialement identifiées dans la moelle osseuse, elles ont depuis été trouvées chez l'homme dans de nombreux autres tissus comme le tissu adipeux ¹⁶⁴, le tissu pulmonaire ¹⁶⁵, ainsi que dans le sang périphérique ¹⁶⁶ et dans le sang de cordon ombilical ¹⁶⁷. Quelque soit leur origine, ces cellules présentent des propriétés angiogènes mais avec une efficacité différente. En effet, il a été montré que les CSM provenant du sang de cordon ombilical prolifèrent et se différencient *in vitro* en ostéocytes bien mieux que les CSM issues de la moelle osseuse ¹⁶⁸. Les CSM isolées à partir du tissu adipeux (ADSC) ont particulièrement été étudiées et leur efficacité pour promouvoir la revascularisation post-ischémique des membres inférieurs a déjà été validée dans de nombreux modèles animaux. Notamment, l'injection de 10^6 ADSC humaines dans des souris nues ayant subi une ligature de l'artère fémorale a permis d'améliorer considérablement la revascularisation du membre ischémique ¹⁶⁹. Une étude faite sur le rat a même montré que les MSC permettent une meilleure perfusion sanguine 21 jours après leur injection par rapport à des BM-MNC, notamment grâce au fait qu'elles se différencient d'avantage en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses ¹⁷⁰. Il semble également que ces cellules issues de patients malades gardent le même potentiel pro-angiogénique que celles provenant d'individus sains, ce qui n'est pas le cas des BM-MNC. En effet, l'injection de CSM issues de la moelle osseuse de patients atteints d'ischémie critique a permis d'améliorer la perfusion sanguine de souris nues ayant une ischémie périphérique induite avec la même efficacité que des CSM issues d'individus sains ¹⁷¹.

Ces résultats prometteurs sont très récents et peu d'études sur l'homme ont actuellement été réalisées. La première, publiée en 2006, a montré que l'injection en intramusculaire de 10^6 CSM issues du sang de cordon ombilical à quatre patients atteints de la maladie de Buerger permet d'éradiquer la douleur au repos, d'améliorer la cicatrisation des zones nécrotiques et d'augmenter la densité capillaire digitale en seulement quatre semaines ¹⁷². Une plus grande étude randomisée, contrôlée et réalisée en double aveugle sur 41 patients diabétiques ayant une ischémie critique, a également permis de montrer que l'injection en intramusculaire de CSM autologues provenant de la moelle osseuse améliore d'avantage et plus rapidement les critères cliniques qu'une injection faite à partir de BM-MNC ¹⁷³. Enfin, un essai clinique de phase I publié en 2013 a mis en évidence l'efficacité de l'injection intra-artérielle des CSM. En effet, les sept patients atteints d'ischémie critique ayant reçus des CSM ont vu tous leurs paramètres cliniques s'améliorer, et pour six des sept patients, leurs ulcères ont complètement ou partiellement cicatrisé ¹⁷⁴. L'utilisation d'ADSC pour traiter l'ischémie critique périphérique représente également une éventuelle alternative aux traitements actuels. En effet, un premier essai pilote réalisé sur quinze patients a montré que de multiples injections en intramusculaire d'ADSC issus de donneurs sains améliorent dès les six premiers mois la douleur, la claudication ainsi que le réseau vasculaire chez 66% des patients ¹⁷⁵.

Les premiers résultats obtenus chez l'homme sont donc très prometteurs et la mise en place rapide d'essais cliniques de thérapie cellulaire autologue à l'aide des CSM pour traiter les pathologies ischémiques humaines devraient déterminer dans les prochaines années l'efficacité réelle de ce traitement.

c. Les progéniteurs endothéliaux

De nombreuses études précliniques faites sur des rats ou des souris nudes ont validé l'efficacité des CPE humaines pour promouvoir la revascularisation post-ischémique. Chez l'homme, la plupart des essais cliniques utilisent cependant des populations hétérogènes de cellules contenant plus ou moins de CPE, car il a été évalué, par extrapolation des doses utilisées dans les modèles animaux, que 19 litres de sang sont nécessaires pour obtenir des doses cliniques de CPE. De plus, il a été montré que les patients atteints d'ischémie critique du membre inférieur présentent moins de CPE circulantes ¹⁷⁶. Ainsi, la recherche actuelle tente d'améliorer l'isolation des CPE à partir du sang et de potentialiser leur efficacité en les pré-conditionnant avant injection (cf chapitre IV, 2. a.). Une technique utilisée pour enrichir la fraction de cellules mononuclées recueillies dans le sang des patients est celle de l'injection préalable de G-CSF qui induit une forte mobilisation des cellules CD34+ dans la circulation sanguine. En utilisant cette méthode, l'équipe d'Asahara a réalisé en 2009 une étude clinique de phase I et II dans laquelle des patients ayant une ischémie critique unilatérale des membres inférieurs ont reçu 10⁵/Kg de cellules CD34+ enrichies en progéniteurs endothéliaux et hématopoïétiques. Cette injection intramusculaire a permis d'améliorer le temps de marche des patients, la douleur au repos et la taille des ulcères, montrant ainsi l'efficacité de la thérapie cellulaire à base de cellules CD34+ enrichies en progéniteurs endothéliaux ¹⁷⁷.

L'utilisation de cellules mononuclées issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique, de cellules mésenchymateuses ou de populations hétérogènes enrichies en progéniteurs endothéliaux semblent donc avoir un effet bénéfique sur l'ischémie critique et ⁵⁹ représente un grand espoir de traitement. Cependant, aucune étude clinique de phase III et à grande échelle n'a encore été réalisée, empêchant toutes conclusions sur l'efficacité de la

thérapie cellulaire et son utilisation courante. De plus, il semble que ces effets bénéfiques varient selon le type cellulaire, leur technique d'isolation, la pathologie traitée et les patients concernés. En effet, contrairement aux études faites sur les modèles animaux standardisés, ces cellules souches adultes humaines sont prélevées directement sur des patients qui bien souvent ont un âge avancé, sont hypertendus, peuvent être diabétiques, fumeurs et/ou présenter une hyperlipidémie. Tous ces facteurs néfastes auxquels sont exposées les cellules souches les rendent moins efficaces. Il a clairement été montré par exemple, que des BM-MNC isolées de patients ayant une ischémie cardiaque chronique ont des capacités à former des colonies *in vitro* et à promouvoir la revascularisation *in vivo* nettement réduites par rapport à des BM-MNC isolées de patients sains ¹⁷⁸. La thérapie cellulaire a donc besoin d'être améliorée et différentes stratégies sont actuellement à l'étude afin de potentialiser l'efficacité des cellules souches adultes.

2. Stratégies pour augmenter l'efficacité de la thérapie cellulaire

a. Pré-conditionnement des cellules souches adultes

Pré-traiter les cellules souches *in vitro* avant leur injection permet de les activer et de potentialiser leurs effets *in vivo* sur la revascularisation. En effet, il a été montré que des BM-MNC exposées à des conditions hypoxiques 24h avant leur injection dans la patte ischémique de rat, induisent une meilleure revascularisation par rapport aux cellules maintenues dans des conditions normoxiques. Ce traitement prépare les cellules à leur environnement mais les

active également puisque les expressions de VEGF ou de VE-cadhérine sont considérablement augmentées ¹⁷⁹. Il est également possible de restaurer le potentiel pro-angiogénique des BM-MNC connu pour être diminué chez les patients diabétiques ou hypercholestérolémiques. En effet, en surexprimant leur Nos, leurs capacités à se différencier en cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* et à sécréter des facteurs pro-angiogéniques comme le NO et le VEGF-A sont augmentés, redonnant à ces cellules leurs capacités à promouvoir la revascularisation post-ischémique ¹⁸⁰.

Pré-traiter les CPE à l'aide de facteurs de croissance pro-angiogéniques permet également de potentialiser leur activité et leur recrutement dans le tissu ischémique. Il a été montré que pré-incuber les CPE avec du VEGF ou du CXCL12 augmente l'expression de certaines sous-unités d'intégrines impliquées dans l'adhésion de ces cellules à l'endothélium. Ainsi, les CPE intègrent d'avantage le tissu ischémique et leur effet sur la revascularisation post-ischémique est amélioré ^{181 131}.

La modulation des micro-ARNs des cellules souches adultes régule également leur activité. De récentes études montrent que les pathologies cardiovasculaires modifient l'expression des micro-ARNs des cellules souches des patients. Le miR-34 notamment, connu pour son effet pro-apoptotique, est surexprimé dans les BM-MNC de patients ayant un infarctus du myocarde. Il a été montré que l'inhibition du miR-34 dans ces BM-MNC améliore leur survie *in vitro* et augmente leur bénéfice thérapeutique dans un modèle murin d'infarctus du myocarde ¹⁸². Les capacités pro-angiogéniques des CPE peuvent également être améliorées en modulant l'expression des mir-10 et mir-21. En effet, il a récemment été montré que l'inhibition du miR-10 ou du mir-21 dans des CPE tardives limite leur sénescence dépendante de la β 2-galactosidase et augmente ainsi leurs capacités pro-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* ¹⁸³.

b. Co-traitements

Au vu des nombreux acteurs moléculaires et cellulaires qui régissent la revascularisation post-ischémique, la co-administration de différents types de cellules souches et/ou facteurs de croissance peut constituer une nouvelle stratégie thérapeutique plus efficace. Une récente étude a montré que les ECFC et les CSM humaines potentialisent toutes deux la revascularisation post-ischémique de souris nudes mais que, contrairement aux CSM, l'efficacité des ECFC passe par leur capacité à se différencier en cellules à phénotype endothéliale. Ces deux progéniteurs ont donc des modes d'actions différents et complémentaires qui révèlent l'intérêt d'une co-thérapie. L'injection concomitante de CSM et d'ECFC améliore d'ailleurs d'avantage la perfusion sanguine de la patte ischémique que leur injection seule ¹⁸⁴.

En plus d'avoir des rôles complémentaires, les progéniteurs peuvent également interagir et stimuler leur activité. C'est le cas des progéniteurs de cellules musculaires lisses (PCML) qui, injectés dans un modèle murin avec des progéniteurs endothéliaux (CPE) ont un effet sur la revascularisation post-ischémique plus important que leur injection seule ou celle de CPE. Il semble que les PCML produisent de l'Ang-1 qui stimulent l'expression de Tie-2 par les CPE augmentant ainsi leurs capacités de survie et de formation d'un réseau vasculaire stable ⁹⁶.

c. Mode d'administration des cellules

En plus du type cellulaire à utiliser pour traiter une pathologie donnée, la question du mode d'administration de ces cellules est encore loin d'être résolue. De nouvelles techniques

actuellement à l'essai tentent d'améliorer la rétention des cellules souches dans le tissu ischémique ainsi que leur survie au sein de ce microenvironnement hostile.

Si l'injection en intraveineux est techniquement facile à réaliser, seulement 3 à 10% des cellules administrées intègrent le tissu ischémique, la grande majorité étant retenue dans les poumons. Afin d'améliorer leur recrutement, une technique toute récente réalisée chez le rat propose de marquer les CPE avec des billes magnétiques et de les attirer vers le muscle cardiaque lésé à l'aide d'un aimant. Cette méthode a montré une meilleure incorporation dans le cœur des CPE labélisées par rapport aux CPE standards ¹⁸⁵. Une injection intramusculaire peut également pallier à ce problème de recrutement même si cette technique n'est pas toujours réalisable. Cependant, la mort ou la destruction massive des cellules durant les premières heures suivant l'injection reste très conséquente avec plus 80% de létalité selon les études. Cette mortalité est probablement due aux contraintes physiques exercées sur les cellules pendant l'injection, au microenvironnement très inflammatoire dans lequel elles arrivent mais également à l'absence de substrat sur lesquelles les cellules pourraient adhérer. Une stratégie actuellement étudiée pour contrer ces contraintes techniques est l'utilisation de biomatériaux qui peuvent modifier la viscosité du milieu, faciliter le transfert des cellules et leur servir de support. Les recherches actuelles montrent qu'administrer des cellules préalablement préparées sous forme de mono ou pluri-couches cellulaires diminue leur apoptose. Déposer ou encapsuler les cellules souches dans des biomatrices décellularisées, des hydrogels contenant du collagène ou de la fibrine semble également propice à leur rétention et donc à leur survie et efficacité

d. Autres types cellulaires

Les cellules souches adultes ont l'avantage de provenir directement du patient et de ne provoquer aucun rejet ou réaction inflammatoire. Cependant, ces cellules souches sont très peu nombreuses et bien souvent leur efficacité est amoindrie par l'âge du patient et tous les facteurs auxquels elles ont été exposées comme le tabac, le diabète ou encore l'hypertension. De plus ces cellules ont une plasticité toute relative qui limite leur potentiel régénératif. Il existe quatre niveaux de plasticité pour une cellule : elle peut être totipotente, pluripotente, multipotente ou unipotente. Les cellules totipotentes sont capables de se différencier en tous types cellulaires et de se structurer en un organisme multicellulaire. Chez l'homme, seuls les blastomères, cellules issues des deux premières divisions qui suivent la fécondation, sont considérés comme totipotents. Les cellules pluripotentes sont capables de se différencier en tous les types cellulaires des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme) y compris les cellules germinales mais ne permettent pas la formation d'un organisme. Les cellules dites « cellules souches embryonnaires » (CSE) sont typiquement des cellules pluripotentes. Les cellules multipotentes peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires mais sont déjà déterminées vers une lignée. C'est le cas des cellules hématopoïétiques et mésenchymateuses. Enfin, les cellules unipotentes ne sont capables de se différencier qu'en un seul type cellulaire mais sont connues pour participer au renouvellement constant de certains organes comme la peau ou la muqueuse intestinale.

L'utilisation de cellules souches pluripotentes en thérapie cellulaire permet de pallier aux limites rencontrées avec les cellules souches adultes. En effet, étant capables de se renouveler de façon quasi-illimitée, il est assez aisé d'en obtenir en culture des quantités suffisantes pour les utiliser en thérapie cellulaire chez l'homme. De plus, ces cellules étant isolées à partir d'embryons, ne présentent pas d'altération de leur efficacité due aux facteurs

extérieurs comme l'âge ou le tabac. Enfin, leur pluripotence permet d'obtenir *in vitro* tous les types de progéniteurs et de cellules différenciées, ce qui laisse un large spectre de possibilités quand à leur utilisation en thérapie cellulaire. A l'heure actuelle, deux types de cellules souches pluripotentes sont particulièrement étudiées : les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (iPS).

- **Les iPS (Induced Pluripotent Stem Cells)**

Les iPCS (Induced Pluripotent Stem Cells) ou iPS sont des cellules souches pluripotentes similaires aux cellules souches embryonnaires (CSE) qui sont générées *in vitro* à partir de cellules matures adultes. En 2007, l'équipe japonaise dirigée par Yamanaka a montré pour la première fois que des fibroblastes adultes du derme humain pouvaient être reprogrammés en cellules souches pluripotentes grâce à la transfection de rétrovirus contenant les quatre facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 ¹⁸⁶. Cette première démonstration de génération d'iPS humaines a ouvert de grandes possibilités d'avancée médicale pour la régénération tissulaire et lui a valu le prix Nobel de Médecine en 2012. En effet, les iPS semblent présenter les mêmes caractéristiques *in vitro* que les CSE mais évitent en plus les problèmes éthiques liés à ces dernières. Elles représentent également une source autologue de cellules souches pluripotentes facilement accessible puisqu'elles dérivent de tissus humains abondants comme la peau ou le tissu adipeux et sont assez aisées à produire. En effet, de nombreux protocoles alternatifs ont depuis été développés par d'autres équipes à travers le monde, utilisant notamment des vecteurs moins agressifs comme des adénovirus, des plasmides ou des micro-ARNs, faisant intervenir d'autres combinaisons de gènes ou de protéines, et utilisant d'autres types de cellules somatiques humaines ¹⁸⁷.

Les iPS étant pluripotentes, elles sont capables de se différencier *in vitro* en tous les types cellulaires, et notamment en cellules vasculaires. Une équipe japonaise a réussi en 2009

à induire et à isoler *in vitro* des cellules endothéliales et des cellules murales à partir d'iPS ¹⁸⁸. L'induction de cellules endothéliales humaines dérivées d'iPS (hiPS-EC) est permise par la mise en culture d'iPS pendant 14 jours avec des milieux spécifiques contenant du BMP-4 et du VEGF. Ces hiPS-EC expriment les marqueurs classiques endothéliaux (CD31, KDR, CD144, eNOS), sont capables de former *in vitro* des structures de type capillaire et sécrètent des facteurs angiogéniques quand elles sont exposées à des conditions hypoxiques. Injectées en intramusculaire dans la patte ischémique de souris nues ayant l'artère fémorale ligaturée, elles potentialisent la revascularisation post-ischémique en augmentant le nombre de capillaires et la perfusion sanguine ¹⁸⁹. Ces premiers résultats sont très prometteurs et représentent un grand espoir pour l'utilisation d'iPS comme traitement des pathologies ischémiques.

Cependant, la découverte et l'utilisation des iPS en thérapie cellulaire sont si récentes qu'il faudra encore plusieurs années de recherche pour confirmer leur fiabilité et leur efficacité. A l'heure actuelle, les similitudes génétique, moléculaire et fonctionnelle entre les iPS et CSE sont encore débattues. Certaines études montrent que leur expression génétique et la méthylation de leur ADN présentent des différences, soutenant l'idée d'une mémoire épigénétique des cellules reprogrammées, alors que d'autres, basées sur de nombreux clones d'iPS et de CSE, révèlent au contraire qu'il est très difficile de les distinguer ¹⁸⁷. Il existe également des variabilités fonctionnelles entre les iPS d'un laboratoire de recherche à un autre, soulignant l'importance des conditions de culture dans lesquelles ces cellules sont générées. Enfin, l'efficacité de leur production est également un facteur limitant pour les utiliser en thérapie cellulaire chez l'homme car moins d'1% des fibroblastes par exemple se différencient en iPS ¹⁸⁷.

- **Les Cellules Souches Embryonnaires (CSE)**

Les cellules souches embryonnaires pluripotentes sont isolées à partir de la couche interne des blastocystes qui sont des embryons sphériques âgés de 5 jours composés d'une centaine de cellules. Ces blastocystes proviennent d'embryons surnuméraires issus de la procréation médicalement assistée qui, même s'ils sont voués à la destruction, peuvent poser des problèmes éthiques. Toutefois, la première lignée primaire de CSE a été réalisée en 1998 par une équipe américaine et la plupart des recherches actuelles se font désormais sur des lignées établies ¹⁹⁰. De plus, au vu de leurs grandes capacités à proliférer, à s'auto-renouveler et à se différencier *in vitro* en tous les types cellulaires, il est difficile d'exclure ces cellules parmi les stratégies thérapeutiques de régénération tissulaire et vasculaire.

Les CSE peuvent être différenciées *in vitro* en cellules vasculaires. Une équipe japonaise a montré que mettre des CSE en culture sur du collagène IV pendant quatre jours permet d'identifier une population de cellules Flk+ (VEGFR2) caractérisées comme étant des progéniteurs de cellules vasculaires et sanguines. Ces cellules Flk1+ sont d'ailleurs capables de former un réseau vasculaire *in vitro* et d'incorporer les vaisseaux néoformés d'embryons de poulet. Elles peuvent également se différencier *in vitro* en cellules endothéliales (CSE-EC) ou en cellules musculaires lisses lorsqu'elles sont traitées avec du VEGF ou du PDGF-BB respectivement ¹⁹¹. Les CSE-EC expriment les marqueurs génétiques et moléculaires spécifiques des cellules endothéliales et forment *in vitro* des structures vasculaires matures de type capillaire. Injectées en intramusculaire dans la patte ischémique de souris nudes préalablement ligaturées au niveau de l'artère fémorale, les CSE-EC potentialisent la revascularisation post-ischémique ¹⁹². Le potentiel des CSE pour promouvoir la revascularisation post-ischémique est d'ailleurs assez surprenant puisqu'il est plus important que celui des CPE humaines issues de sang périphérique ou de sang de cordon ombilical ¹⁹³.

Il est possible à l'heure actuelle d'obtenir des progéniteurs de différentes lignées à divers stades de différenciation à partir de ces CSE pluripotentes. Notamment, traiter les CSE avec du BMP2 (Bone Morphogenic Protein 2) et Wnt3a permet d'engager ces cellules vers une lignée mésodermique et d'obtenir des progéniteurs cardiovasculaires caractérisés par l'expression d'Oct-4, MESP-1 (Mesoderm Posterior 1) et SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen 1). L'expression de SSEA-1 signe la perte de pluripotence de ces cellules qui, injectées dans le myocarde ischémique de primates, ne développent pas de tératomes, contrairement aux cellules SSEA-1⁻. Ces progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1⁺ sont particulièrement efficaces et ont été retrouvés, deux mois après leur injection, incorporés dans le myocarde des primates exprimant soit des marqueurs de cellules endothéliales, soit de cellules musculaires lisses ou de cardiomyocytes ¹⁹⁴. Ces cellules SSEA-1⁺ peuvent également donner naissance *in vitro* à des progéniteurs de cardiomyocytes, de cellules musculaires lisses ou de cellules endothéliales lorsqu'elles sont traitées avec du BMP2/FGF2, PDGF-BB ou du VEGF-A respectivement. Ainsi, ces cellules souches embryonnaires multipotentes ont des capacités de différenciation telles qu'elles semblent être un candidat idéal pour la thérapie cellulaire. **Le troisième article de cette thèse révèle l'incroyable potentiel de ces progéniteurs cardiovasculaires pour traiter l'ischémie du membre inférieur dans un modèle murin.**

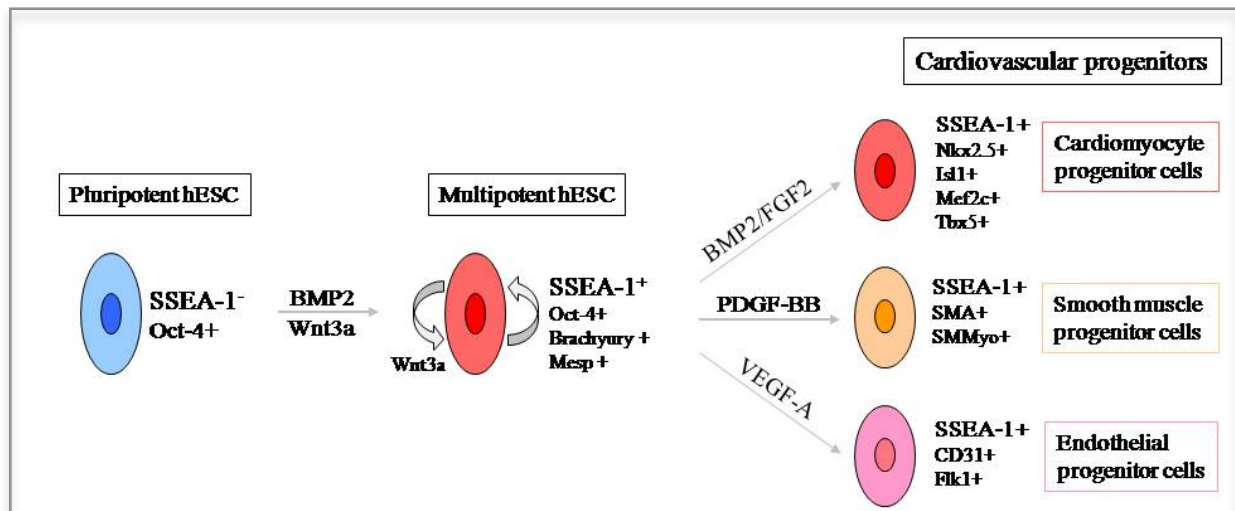


Figure 18: Différenciation *in vitro* des CSE en progéniteurs cardiovasculaires.

D'après M. Pucéat, JCI, 2010

RESULTATS

I. Article 1 : Sympathetic Nervous System Regulates Bone Marrow-Derived Cell Egress Through Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation: Role in Postischemic Tissue Remodeling

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 January 19; 32:643-653

Alice Récalde, Adèle Richart, Coralie Guérin, Clément Cochain, Yasmine Zougari, Kiave Ho Wang Yin, José Vilar, Isabelle Drouet, Bernard Lévy, Odile Varoquaux, Jean-Sébastien Silvestre.

La mobilisation des cellules d'origine médullaire ainsi que leur recrutement dans le tissu ischémique sont des facteurs déterminants pour la revascularisation post-ischémique. Diverses cytokines angiogéniques dont le VEGF-A participent à la mobilisation des progéniteurs en activant directement au niveau de la moelle osseuse des métalloprotéinases (MMP-9) qui dégradent certaines molécules à l'origine de la rétention des cellules comme la chimiokine CXCL12 et le ligand membranaire KitL^{98 99 100}. Il a récemment été montré que le système nerveux sympathique (SNS), et plus particulièrement la norépinephrine (NE), participe également à la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques en activant la dégradation médullaire des ostéoblastes et de CXCL12¹⁰⁶. Le rôle exact des catécholamines reste cependant encore controversé puisqu'il a été montré que la dopamine (DA) peut inhiber la mobilisation des CPE via son récepteur D2 dans un contexte tumoral mais, paradoxalement, activer la mobilisation des cellules Sca-1+cKit+Lin- via son récepteur D5^{106 107}. Dans un contexte d'ischémie critique périphérique, les catécholamines semblent toutefois participer à la collatéralisation et à l'angiogenèse du tissu lésé¹⁰⁸. Si de récentes études ont montré que la

NE et la DA stimulent la production de NO, les processus par lesquels les catécholamines modulent la revascularisation post-ischémique restent encore très mal décrits^{110 111}.

L'objectif de ce premier travail a donc été de comprendre l'effet de la NE et de la DA sur la revascularisation post-ischémique et d'identifier leurs mécanismes d'action dans le contexte de l'ischémie critique du membre inférieur.

- **Les catécholamines promeuvent la revascularisation post-ischémique en favorisant le recrutement des cellules d'origine médullaire**

Le premier résultat de ce travail a été la mise en évidence de l'effet bénéfique des catécholamines sur la revascularisation post-ischémique. En effet, traiter des souris ayant une ischémie du membre inférieur avec de la DA ou de la NE améliore leurs densités capillaire et artériolaire, leur score angiographique ainsi que la perfusion sanguine de leurs pattes ischémiques. Nous avons également constaté, par immuno-histochimie, que ces deux types de catécholamines favorisent le recrutement des cellules d'origine médullaire dans le muscle ischémique. De plus, nos travaux menés *in vitro* montrent que traiter des cellules mononuclées issues de la moelle osseuse (BM-MNC) avec de la DA ou de la NE favorise leur prolifération, leur différenciation en cellules à phénotype endothéliale ainsi que leur production de NO.

- **Les catécholamines activent l'inflammation**

La deuxième partie de ce travail a permis de montrer que la DA et la NE activent l'inflammation, acteur crucial de la régénération vasculaire post-ischémique. En effet, traiter des souris avec l'une de ces deux catécholamines augmente le nombre de monocytes circulants dans le sang au 3^{ème} jour suivant l'ischémie, révélant ainsi une activation de la mobilisation. Les catécholamines stimulent également l'infiltration des cellules

inflammatoires dans le muscle ischémique puisque nous y avons observé une augmentation du nombre de macrophages. Enfin, nous avons mis en évidence que l'effet de la DA et de la NE dépend notamment de la chimiokine CCL2 (MCP-1) puisque leur effet bénéfique sur la revascularisation post-ischémique est aboli en présence d'un anticorps anti-CCL2.

- **Les catécholamines contrôlent la mobilisation des cellules médullaires en augmentant l'expression de la eNOS**

24h après l'ischémie, nous observons dans la moelle osseuse une augmentation de l'expression de la tyrosine hydroxylase, enzyme à l'origine de la synthèse des catécholamines, de la DA, la NE, ainsi que de la eNOS. Nous avons également constaté que traiter des souris déficientes pour la eNOS (eNOS^{-/-}) avec de la DA ou de la NE ne potentialise plus la revascularisation post-ischémique comme chez les souris contrôles. De plus, les souris eNOS^{-/-} traitées avec des catécholamines ont nettement moins de cellules originaires de la moelle osseuse, progénitrices (CD45+CD34+) ou à phénotype endothéliale (CD45+VEGFR2+) dans la circulation sanguine et dans le muscle ischémique, 1 et 3 jours après l'ischémie, par rapport aux souris contrôles. Ces résultats mettent en évidence que les catécholamines participent à la mobilisation des cellules médullaires dans la circulation sanguine par un mécanisme dépendant de la eNOS.

Ce premier travail a donc permis de montrer que le SNS, via une signalisation dépendante de la eNOS, active la revascularisation post-ischémique en régulant la mobilisation des progéniteurs vasculaires et des cellules inflammatoires originaires de la moelle osseuse.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

Sympathetic Nervous System Regulates Bone Marrow–Derived Cell Egress Through Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation : Role in Postischemic Tissue Remodeling
Alice Récalde, Adèle Richart, Coralie Guérin, Clément Cochain, Yasmine Zouggari, Kiave Ho Wang Yin, José Vilar, Isabelle Drouet, Bernard Lévy, Odile Varoquaux and Jean-Sébastien Silvestre

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32:643-653; originally published online January 19, 2012;
doi: 10.1161/ATVBAHA.111.244392

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272
Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/32/3/643>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Sympathetic Nervous System Regulates Bone Marrow–Derived Cell Egress Through Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation

Role in Postischemic Tissue Remodeling

Alice Récalde, Adèle Richart, Coralie Guérin, Clément Cochain, Yasmine Zouggar, Kiave Ho Wang Yin, José Vilar, Isabelle Drouet, Bernard Lévy, Odile Varoquaux, Jean-Sébastien Silvestre

Objective—Catecholamines have been shown to control bone marrow (BM)–derived cell egress, yet the cellular and molecular mechanisms involved in this effect and their subsequent participation to postischemic vessel growth are poorly understood.

Methods and Results—Tyrosine hydroxylase mRNA levels, as well as dopamine (DA) and norepinephrine (NE) contents, were increased in the ischemic BM of mice with right femoral artery ligation. Angiographic score, capillary density, and arteriole number were markedly increased by treatments with DA (IP, 50 mg/kg, 5 days) or NE (IP, 2.5 mg/kg, 5 days). Using chimeric mice lethally irradiated and transplanted with BM-derived cells from green fluorescent protein mice, we showed that DA and NE enhanced by 70% ($P<0.01$) and 62% ($P<0.001$), respectively, the number of green fluorescent protein–positive BM-derived cells in ischemic tissue and promoted their ability to differentiate into cells with endothelial and inflammatory phenotypes. Similarly, both DA and NE increased the in vitro differentiation of cultured BM-derived cells into cells with endothelial phenotype. This increase was blunted by the nitric oxide synthase inhibitor *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester. DA and NE also upregulated the number of CD45-positive cells in blood 3 days after ischemia and that of macrophages in ischemic tissue 21 days after ischemia. Of interest, DA and NE increased BM endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels and were unable to promote BM-derived cell mobilization in chimeric eNOS-deficient mice lethally irradiated and transplanted with BM-derived cells from wild-type animals. Furthermore, administration of a β_2 adrenergic agonist (clenbuterol, IP, 2 mg/kg, 5 days) and that of a dopaminergic D1/D5 receptor agonist (SKF-38393, IP, 2.5 mg/kg, 5 days) also enhanced BM-derived cell mobilization and subsequently postischemic vessel growth.

Conclusion—These results unravel, for the first time, a major role for the sympathetic nervous system in BM-derived cell egress through stromal eNOS activation. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:643–653.)

Key Words: angiogenesis ■ catecholamines ■ ischemia ■ nitric oxide ■ nitric oxide synthase

Mobilization and recruitment of bone marrow (BM)–derived cells are of paramount importance and occupy a predominant hierarchical role in the orchestration of tissue remodeling after ischemia. Progenitor cells maintenance and mobilization in the BM are controlled by various cytokines, including colony-stimulating factors and angiogenic cytokines¹ and involve activation of proteinases, such as elastase, cathepsin G, and the matrix metalloproteinases (MMPs). Among them, MMP-9 up-regulation results in the release of soluble Kit-ligand expressed by stromal cells and in the activation of BM progenitor cells motility and mobilization.² Furthermore, MMP-9 was demonstrated to be essential for vascular

endothelial growth factor (VEGF)–induced, CXCL12–induced, and placenta growth factor–induced progenitor cell mobilization. It is also known that BM-derived endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is a substantial component of the stem cell niche and is required for the mobilization of BM-derived progenitor cells^{3–5}. Of interest, eNOS-deficient mice show a profoundly reduced basal activity of pro-MMP-9. As a consequence, the MMP-9 mediated release of soluble Kit-ligand from membrane KitL is reduced in eNOS-lacking mice.³ In addition, mice deficient in eNOS show reduced vascular endothelial growth factor–induced mobilization of endothelial progenitor cells.³ Reendothelialization and endothelial progenitor

Received on: June 28, 2011; final version accepted on: January 4, 2012.

From Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U970, Paris Cardiovascular Research Center–PARCC, Paris, France (A. Récalde, A. Richart, C.G., C.C., Y.Z., K.H.W.Y., J.V., B.L., J.-S.S.); Université Paris Descartes, UMR-S970, Paris, France (A. Récalde, A. Richart, C.G., C.C., Y.Z., K.H.W.Y., J.V., B.L., J.-S.S.); Département de Biochimie-Pharmacologie-Toxicologie, Hôpital A. Mignot, Le Chesnay, France (I.D., O.V.).

Correspondence to Jean-Sébastien Silvestre, Paris Cardiovascular Research Center, INSERM U970, Université Paris Descartes, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France. E-mail jean-sebastien.silvestre@inserm.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.244392

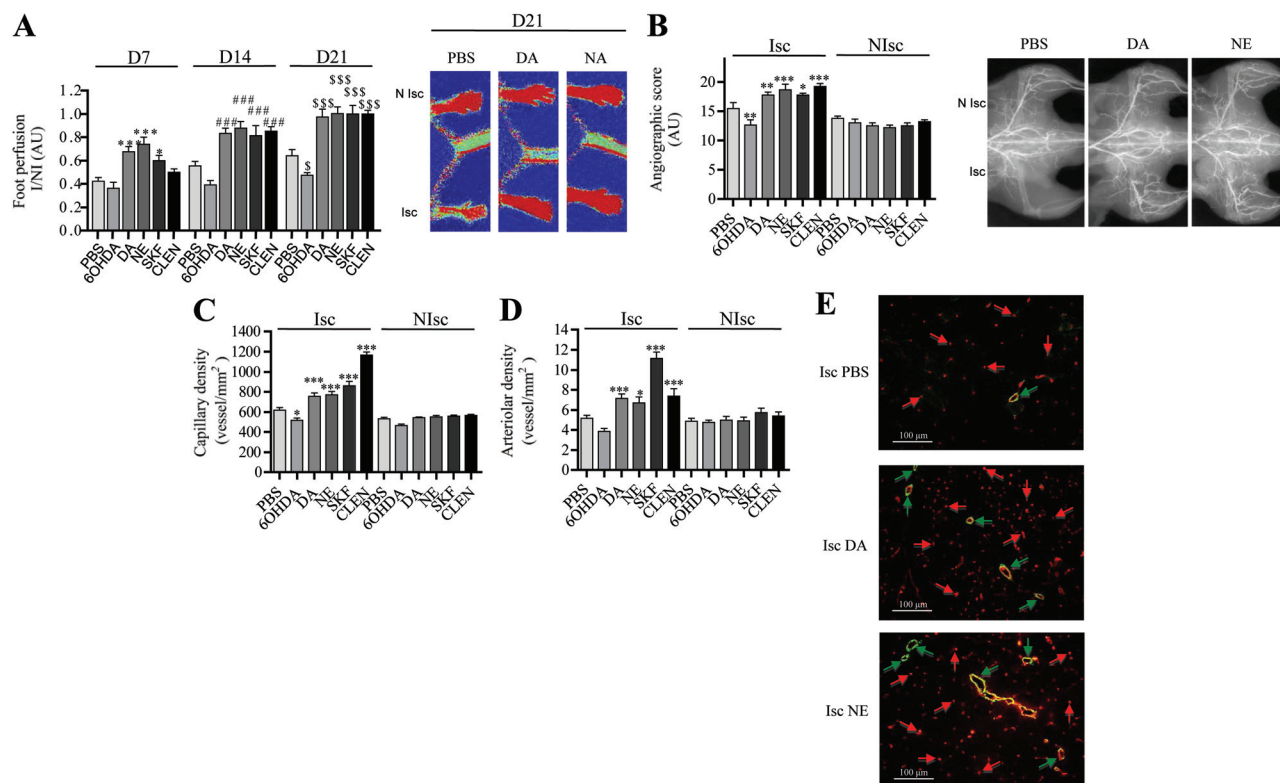


Figure 1. Quantitative evaluation and representative photomicrographs of foot perfusion 7, 14, and 21 days after ischemia (**A**) and microangiography (vessels appear in white) (**B**), capillary density (**C**), and arteriole density (**D**) 21 days after ischemia in C57BL/6 mice treated with or without PBS, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), dopamine (DA), norepinephrine (NE), the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 (SKF) and the β_2 adrenergic receptor agonist clenbuterol (CLEN). **E**, Representative photomicrographs of capillaries and arterioles densities. Capillaries appear in green, green arrows indicate BSA-IB4-positive capillaries and arterioles appearing in red, and red arrows show α -actin-positive arterioles. Isc indicates ischemic legs; NIsc, nonischemic legs; AU, arbitrary units. Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS; ### $P < 0.001$ vs PBS D14; \$\$\$ $P < 0.001$ vs PBS D21.

cell mobilization into the peripheral circulation after injury are also reduced in eNOS-deficient mice.⁴ Finally, after ischemic challenge, eNOS knockout animals have defects in arteriogenesis and pericyte recruitment.⁶

It is now well established that BM and secondary lymphoid tissues are innervated by noradrenergic sympathetic nerve fibers, which release catecholamines from the sympathetic nerve terminals.⁷ Recent evidence suggests that catecholamines are also able to control BM-derived cell egress.^{8–10} Inhibition of adrenergic neurotransmission induces osteoblast suppression, bone CXCL12 downregulation, and hematopoietic stem cell mobilization.⁸ Moreover, administration of a β_2 adrenergic agonist enhances mobilization in both control and norepinephrine (NE)-deficient mice.⁸ Dopamine (DA) may also control BM-progenitor cell mobilization, but its role remains controversial. DA-induced activation of D2 receptor has been shown to inhibit tumor-induced mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) from BM to circulation, vascularization, and subsequently tumor growth.⁹ In contrast, the myeloid cytokines granulocyte colony stimulating factor and granulocyte monocyte stimulating factor have been described to upregulate D5 receptor expression on immature CD34⁺ cells and thus treatment with DA enhances BM Sca-1⁺c-Kit⁺Lin[−] cell numbers.¹⁰

During hindlimb ischemia, catecholamines have been proposed to contribute to collateral growth and angiogenesis in ischemic tissue. DA β -hydroxylase-deficient mice lacking cat-

echolamines synthesis show an inhibition of leukocytes accumulation in the adventitia/periadventitia of collaterals and a decrease in α -smooth muscle actin-positive vessels.¹¹ In line with these results, adenoviral-mediated gene transfer of the human β_2 adrenergic receptor to the endothelium of the rat femoral artery results in ameliorated angiographic blood flow and hindlimb perfusion after chronic ischemia, whereas angiogenesis is severely impaired in β_2 adrenergic receptor-deficient mice subjected to femoral artery resection.^{12,13} Of interest, DA and NE are well-established activators of eNOS through cAMP/protein kinase activation and inhibition of Rho/Rho kinase-related pathway.^{14,15}

Here, we show that catecholamines regulated BM-derived hematopoietic cells and vascular progenitor cell mobilization from BM to blood, leading to activation of their recruitment in ischemic tissue and of vessel growth in mice with hindlimb ischemia. These effects were fully blunted in lethally irradiated eNOS-deficient animals transplanted with BM from wild-type (WT) mice, highlighting a crucial role of stromal eNOS in catecholamine-induced mobilization of BM-derived progenitor cells.

Materials and Methods

Hindlimb Ischemia

Experiments were conducted according to the French veterinary guidelines and those formulated by the European Community for experimental animal use (L358-86/609EEC). WT C57BL/6 mice (n=10 per

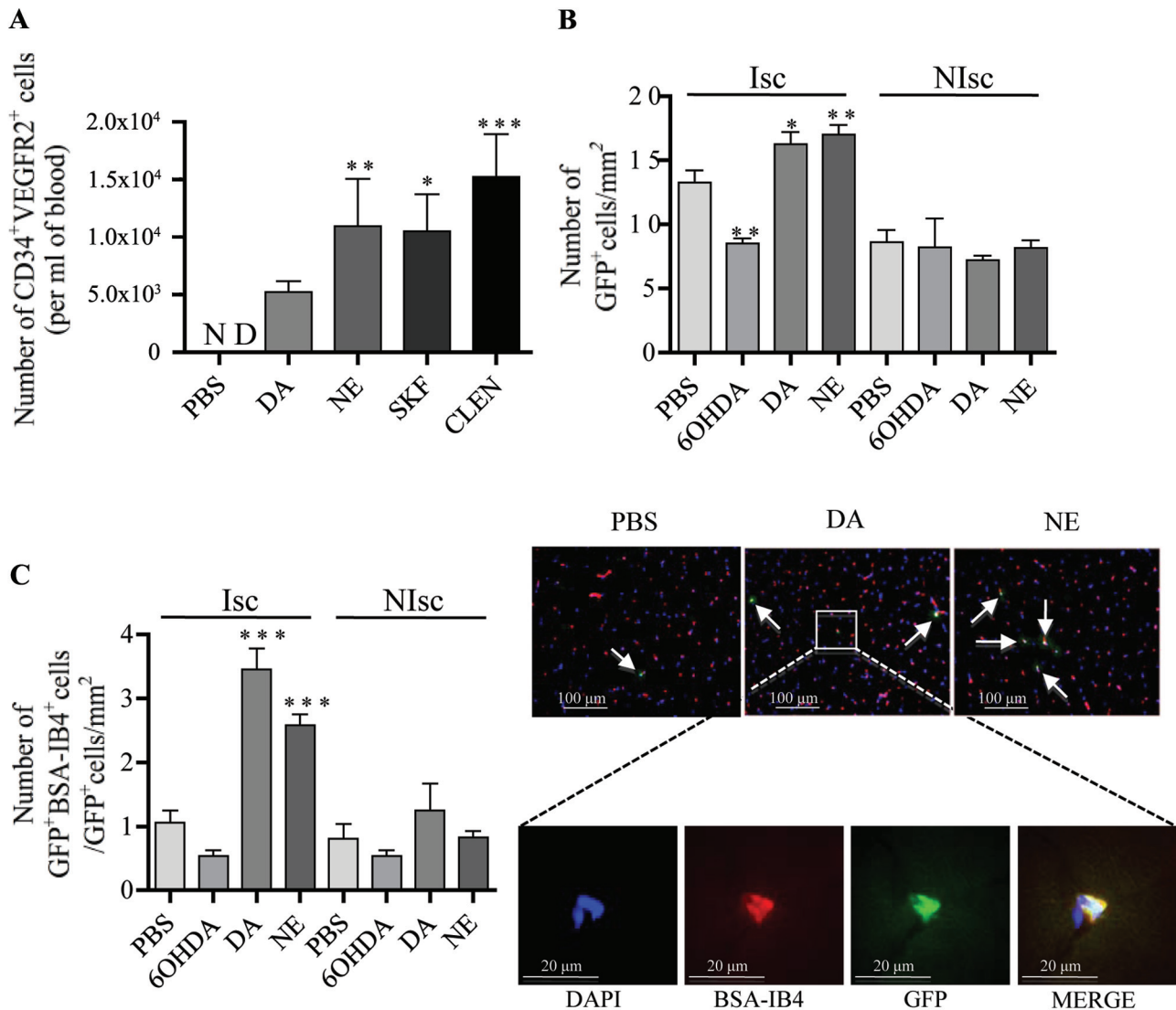


Figure 2. **A**, Quantitative evaluation by flow cytometry analysis of CD34 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-positive cells in blood of mice treated with or without PBS, dopamine (DA), norepinephrine (NE), the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 (SKF), and the β_2 adrenergic receptor agonist clenbuterol (CLEN). $n=10$ per group. **B**, Quantitative evaluation of green fluorescent protein (GFP)-positive cells in ischemic muscle of wild-type (WT) chimeric mice irradiated and transplanted with bone marrow (BM) from GFP mice and treated with or without PBS, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), DA, or NE 5 days after ischemia. **C**, Quantitative evaluation and representative photomicrographs of incorporated BM-derived GFP⁺-BSA-IB4⁺ cells (GFP-positive cells appear in green, BSA-IB4 positive cells in red; nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole [blue]) in chimeric mice treated with or without PBS, 6-OHDA, DA, or NE. Isc indicates ischemic legs; NIsc, nonischemic legs; ND, not detected. Values are mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs PBS.

group) treated with or without 6-hydroxydopamine, leading to a chemical destruction of peripheral catecholaminergic fibers (6-hydroxydopamine, 250 mg/kg 1 day before ligation and 100 mg/kg 1 day after ligation, IP, Sigma), DA (50 mg/kg, 5 days, IP, Sigma), NE (2.5 mg/kg, 5 days IP, Sigma), the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 (2.5 mg/kg, 5 days, IP, Sigma), and the β -adrenergic receptor agonist clenbuterol (2 mg/kg, 5 days, IP, Sigma) underwent surgical ligation of the proximal part of the right femoral artery, above the origin of the circumflexa femoris lateralis, as previously described.¹⁶ In additional experiments, mice receiving DA and NE were also treated with or without a neutralizing antibody directed against the monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) (IP, 45 μ g per mouse at 0, 1, 3, 5, and 7 days after the onset of ischemia).

Ten-week-old CD45.2 C57BL/6 and CD45.2 eNOS-deficient mice underwent medullary aplasia by total body irradiation (9.5 gray). BM cells were then isolated from femurs and tibias of green fluorescent protein (GFP) C57BL/6 or CD45.1 C57BL/6

WT and intravenously injected into irradiated animals. After 6 weeks, mice underwent surgical ligation of the proximal part of the right femoral artery and were treated as described above.

At the end of the treatment period, mice were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg), and microangiography was performed as previously described.¹⁶ Paw perfusion was also assessed by laser Doppler imaging.

Immunohistochemistry

Calf muscles were frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Frozen sections (7 μ m) were then incubated with antibodies directed against Mac-3 (1:100, BD Pharmingen) or α -smooth muscle cell actin (1:100, Abcam) or fluorescein isothiocyanate (FITC)-*Bandeiraea simplicifolia* agglutinin isolectin B4 (BSA-IB4, 1:100, Sigma) for 1 hour at room temperature. To demonstrate incorpora-

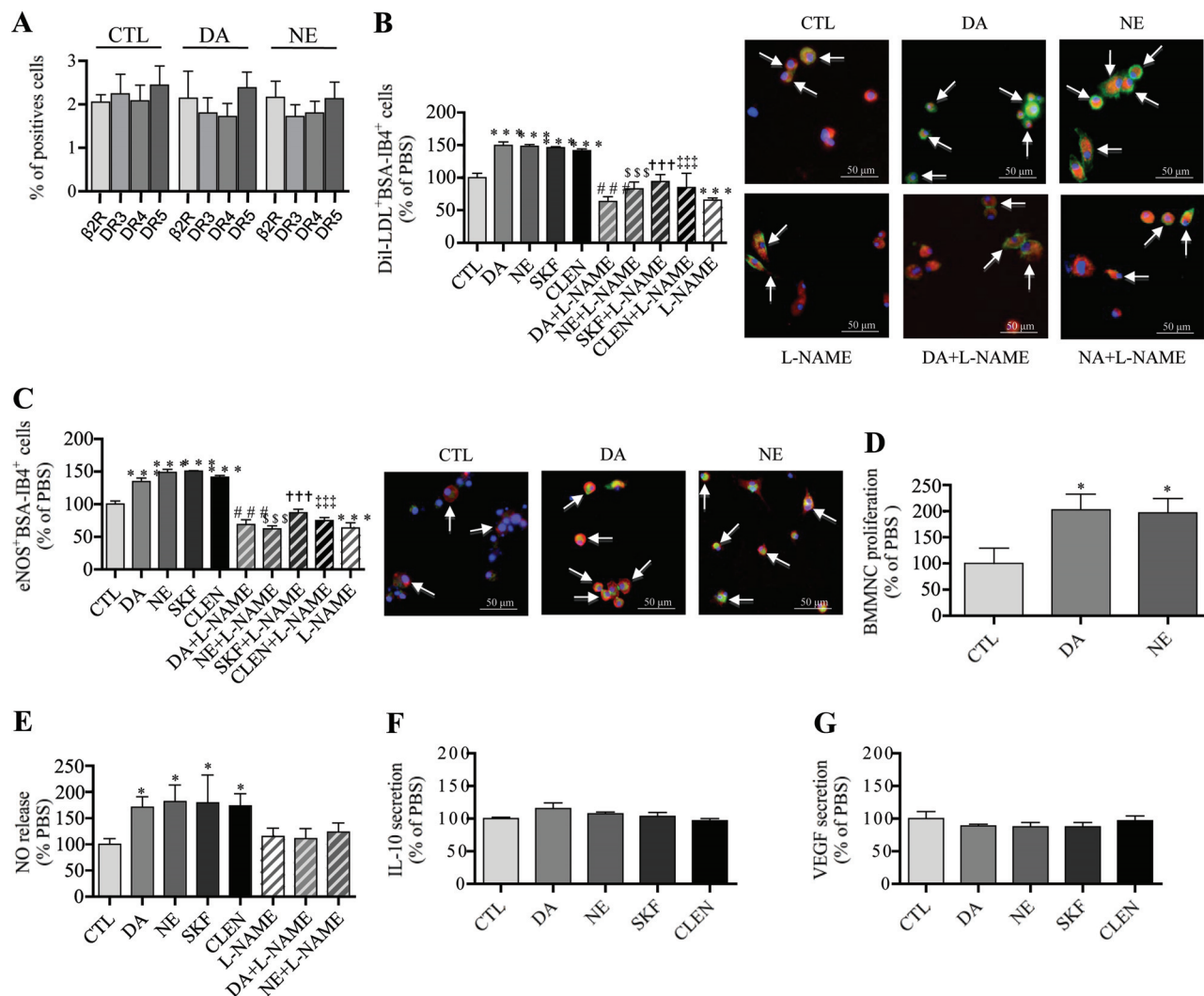


Figure 3. **A**, Cell surface expression of $\beta 2$, D3, D4, and D5 receptors by cultured BM mononuclear cells (BMMNCs) treated with or without dopamine (DA) or norepinephrine (NE) for 6 days. **B** and **C**, Quantification of the percentage of BMMNCs double-positively stained for BSA-IB4 and Dil-labeled acetylated low-density lipoprotein (Dil-LDL) (**B**) or BSA-IB4 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (**C**) compared with cells with endothelial phenotype. **Right (B and C)**, representative images of BMMNC cultures. Arrows indicate double-positive cells with endothelial phenotype, respectively, for Dil-LDL (red) and BSA-IB4 (green) or eNOS (red) and BSA-IB4 (green). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue) (**B** and **C**). Cultured BMMNCs were treated with or without DA, NE, the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 (SKF), or the $\beta 2$ adrenergic receptor agonist clenbuterol (CLEN) in the presence or absence of *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (nitric oxide synthase inhibitor). Data are presented as mean \pm SEM. ****P* < 0.001 vs untreated control cells (CTL), ###*P* < 0.001 vs DA, \$\$\$*P* < 0.001 vs NE, †††*P* < 0.001 vs SKF, ‡‡‡*P* < 0.001 vs CLEN. **D** to **G**, Quantitative evaluation of BMMNC proliferation (**D**), as well as NO (**E**), interleukin (IL)-10 (**F**), and vascular endothelial growth factor (VEGF) (**G**) release by cultured BMMNCs treated with or without DA, NE, the D1/D5 receptor agonist SKF, or the $\beta 2$ adrenergic receptor agonist CLEN in the presence or absence of L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor). Values are mean \pm SEM. **P* < 0.05 vs CTL.

tion of BM-derived cells into ischemic muscles, the gastrocnemius muscles of BM GFP chimeric mice were harvested 4 days after the onset of ischemia. Incorporated GFP-BM-derived cells were detected by immunostaining with antibody directed against GFP (1:200, Abcam) and a rhodamin-BSA-IB4 (1:100, Sigma) or with antibody directed against Mac-3 (1:100, BD Pharmingen) followed by incubation with antibody goat anti-rat Alexa Fluor 594 (1:100, Invitrogen).

Flow Cytometry Analysis

CD45.1 chimeric mice or WT animals were also used for analysis of circulatory cells infiltration. At time of euthanasia, ischemic gastrocnemius muscles were weighed, minced, and digested in 4500 U/mL collagenase I, 1250 U/mL collagenase XI, 60 U/mL DNase I, and 1000 U/mL hyaluronidase (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 37°C. BM-derived cell, blood cell, and ischemic muscle

cell suspensions were layered on Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) for gradient density centrifugation. All cell suspensions were labeled with FITC-conjugated anti-CD45.1 (clone A20, BD Biosciences), PerCP-conjugated anti-CD45.2 (clone 30-F11, BD Pharmingen), FITC-conjugated anti-CD11b (BD Biosciences), phycoerythrin-conjugated anti-Ly6G (clone: 1A8, BD Pharmingen), APC-conjugated anti-7/4 (ABD Serotec), APC-conjugated anti-CD34 (ABD Serotec), phycoerythrin-conjugated anti-VEGF receptor 2 (VEGFR2) (Clone: Avas12a1, eBioscience) antibody. Cells were analyzed by flow cytometry using a LSRII device (Becton Dickinson). BM-derived cells or cultured BM mononuclear cells (BMMNCs) were also labeled with rabbit anti-D3 receptor (Abcam), anti-D4 receptor (Abcam), anti-D5 receptor (Alomone Labs) and anti- $\beta 2$ receptor (Abcam) antibodies followed by incubation with phycoerythrin-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Abcam).

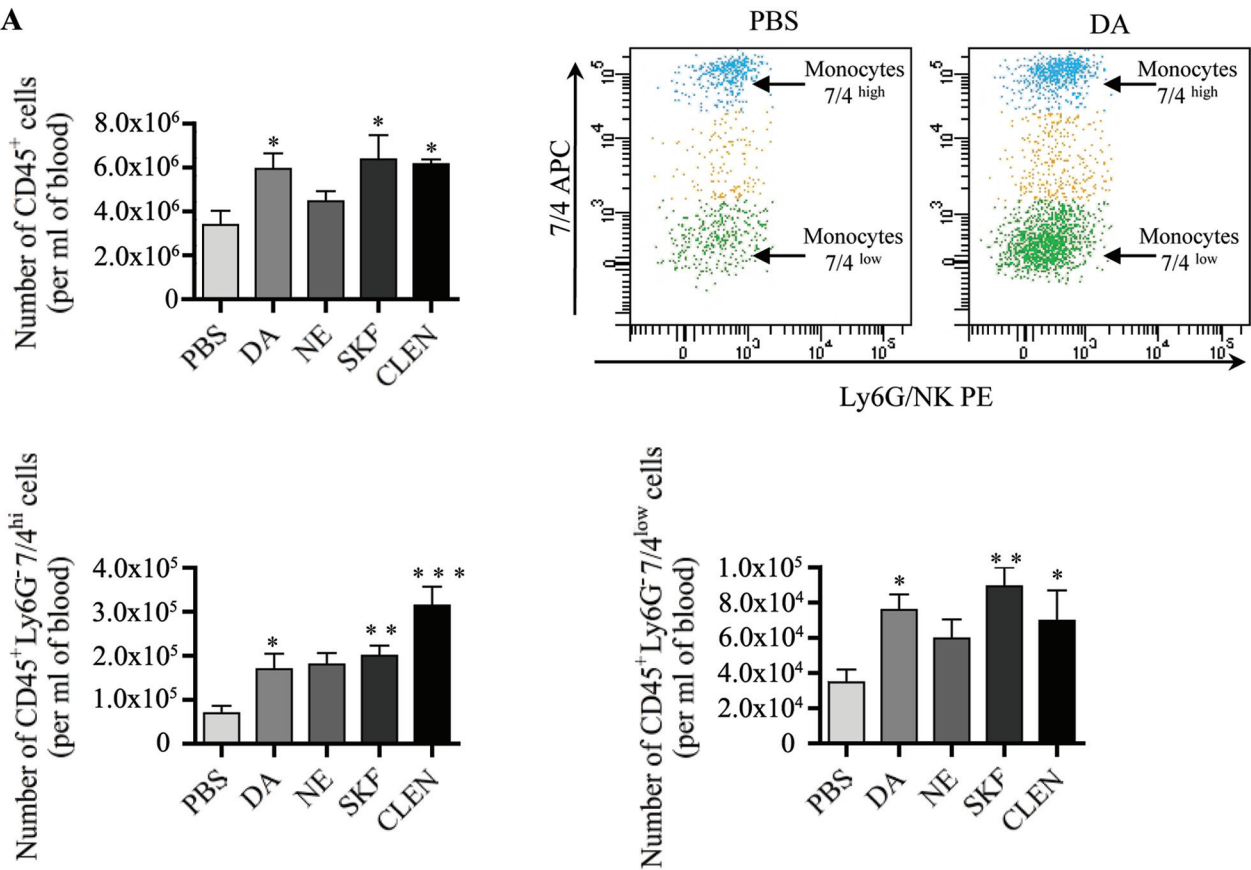
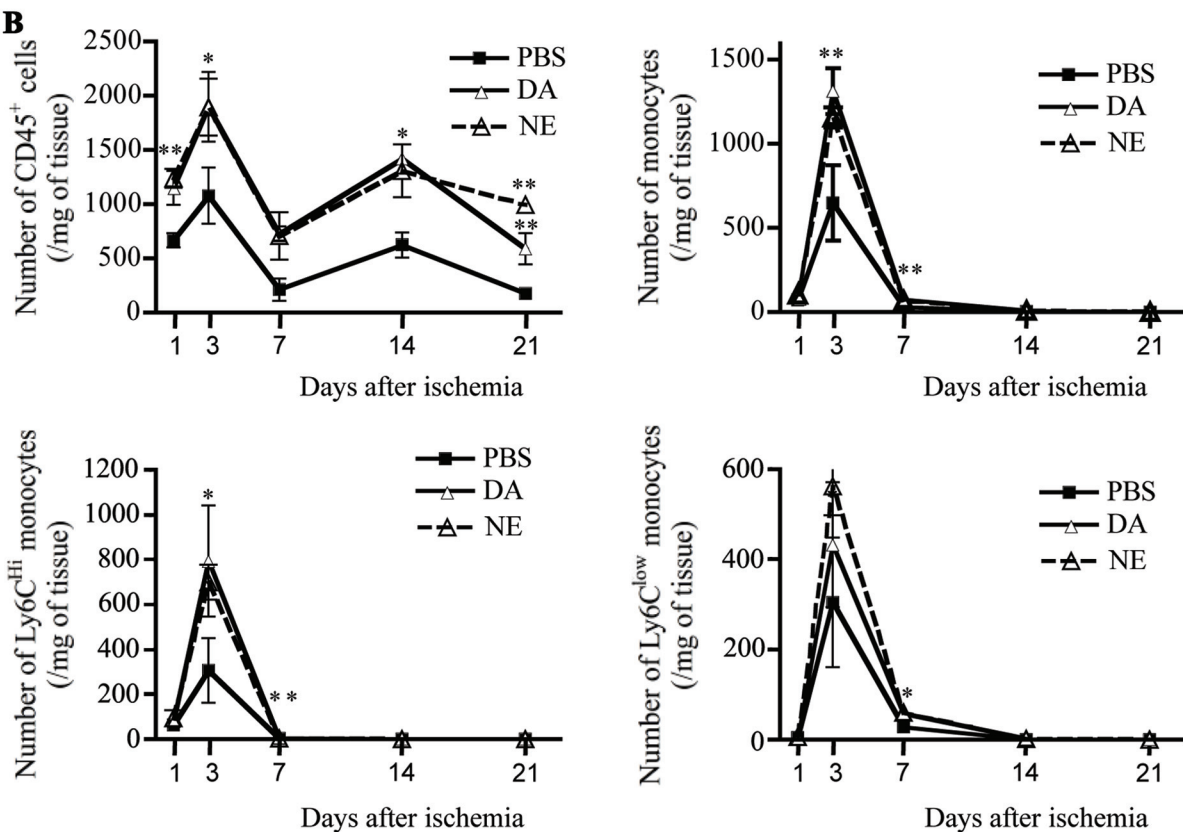
A**B**

Figure 4. A, Quantitative evaluation of the number of circulating cells positive for CD45 and the number of 7/4^{hi}/CD45⁺/Ly6G⁻ monocytes and 7/4^{lo}/CD45⁺/Ly6G⁻ monocytes, 3 days after ischemia in blood of mice treated with or without dopamine (DA),

Isolation and Treatment of BMMNCs

BMMNCs were isolated by density gradient centrifugation with Histopaque 1083. BMMNCs were first plated on plastic, nonadherent cells were removed and then plated at a density of 1×10^6 cells per cm^2 on 24-well plates (Nunc) coated with $10 \mu\text{g/mL}$ fibronectin (Sigma) and cultured up to 6 days in Endothelial Cell Basal Medium 2. Cells were then treated for 6 days with or without DA (10 nmol/L , Sigma), NE (1 mmol/L , Sigma), SKF-38393 (30 mmol/L , Sigma), Clenbuterol (1 mmol/L , Sigma). BMMNCs were also treated with or without *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (nitric oxide synthase inhibitor, 10^{-5} mol/L ; Sigma). Endothelial cell phenotype was revealed by double-positive staining for FITC-labeled BSA-IB4 (Sigma) and DiI-labeled acetylated low-density lipoprotein (Molecular Probes) or with goat anti-eNOS antibody (Affinity Bioreagent) and subsequently goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 antibody (Invitrogen), as previously described.^{17,18} These double-positive cells were negative for the monocytic marker CD45 (data not shown). Cell numbers were counted and expressed in cells per field. Three fields from each culture were counted.

Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

cDNA synthesis was performed with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Polymerase chain reaction was performed on StepOne Plus real time polymerase chain reaction system (Applied Biosystems) using SYBR green (Mesagreen, Eurogentec). Mouse GAPDH was used to normalize samples amplification. The following oligonucleotides served as primers: GAPDH forward, 5'-CGT-CCC-GTA-GAC-AAA-ATG-GTG-AA-3', reverse, 5'-GCC-GTG-AGT-GGA-GTC-ATA-CTG-GAA-CA-3'; eNOS forward, 5'-GCA-TCG-GCA-GCC-AAA-CAC-CAA-AGT-3', reverse, 5'-CGC-CCA-CCC-AGG-AGA-GAT-CCA-C-3'; tyrosine hydroxylase, forward, 5'-GCC-GTC-TCA-GAG-CAG-GAT-ACC-A-3', reverse, 5'-CCG-CCG-TCC-AAT-GAA-CCT-T-3'.

Catecholamine Synthesis

Briefly, the animals were euthanized, their femurs and tibias were dissected, and the BM was flushed out with 5 mL of ice-cold 0.6 mol/L perchloric acid containing 1.7 mg/mL ethylene glycol tetraacetic acid and 1.1 mg/mL reduced glutathione. Samples were centrifuged for 15 minutes at $2500g$ at 0°C , and DA and NE were assayed into the high-performance liquid chromatography system, as previously described.^{9,19}

BMMNC Paracrine Potential

Culture medium was collected and analyzed for VEGF-A and interleukin-10 by ELISA (R&D Systems). In addition, NO production was assessed by measuring intracellular nitrosation of the NO-sensitive fluorochrome 4,5-diaminofluorescein diacetate (Alexis Biochemicals). Briefly, BMMNCs were incubated with $10 \mu\text{mol/L}$ 4,5-diaminofluorescein diacetate for 3 hours (37°C). Exposure to light was avoided as far as possible throughout experimentation. Supernatants were then removed, and cells were washed in fresh 4,5-diaminofluorescein diacetate-free buffer followed by immediate fluorescence-activated cell sorting analysis. A Becton Dickinson LSRII analyzer was used to quantify fluorescence (excitation wavelength 488 nm , emission wavelength 530 nm) at the single-cell level, and data were analyzed using FACSDiva software.

Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Kruskal-Wallis analysis of variance was used to compare each parameter. Post hoc Mann-Whitney *U* tests with Bonferroni correction were then performed to identify

which group differences accounted for the significant overall Kruskal-Wallis values. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Catecholamines Enhance Postischemic Revascularization

Acute treatments with DA and noradrenaline did not affect systolic blood pressure (98.5 ± 3.1 and $100.6 \pm 3.5 \text{ mm Hg}$, respectively, compared with $99.4 \pm 2.8 \text{ mm Hg}$ in PBS-receiving animals) or heart rate (508 ± 21 and $505 \pm 23 \text{ bpm}$, respectively, compared with $526 \pm 19 \text{ bpm}$ in PBS-receiving animals), 21 days after the onset of ischemia.

We then assessed the effect of catecholamines on postischemic neovascularization. DA and NE treatments increased foot perfusion, whereas sympathectomy induced by 6-hydroxydopamine administration hampered tissue perfusion recovery (Figure 1A). These results were confirmed by angiographic score and by capillary and arteriole density (Figure 1B–1E) analysis, demonstrating that catecholamines enhanced revascularization process after hindlimb ischemia. Of interest, SKF-38393, a D1/D5 dopaminergic receptor agonist, and clenbuterol, a β_2 adrenergic receptor agonist, also highly increased foot perfusion, angiographic score, and capillary and arteriole densities, suggesting that catecholamine-related effects on postischemic revascularization resulted from D1/D5 receptor and β_2 receptor activation.

Catecholamines Increase Mobilization and Recruitment of BM-Derived Cells

BM-derived cells have been shown to participate in tissue regeneration after ischemia.^{3,4}

Catecholamines and BM-Derived Cells With Endothelial Cell Phenotype

We first assessed the effect of catecholamines on vascular progenitor cell mobilization to blood and recruitment to ischemic tissue. Three days after ischemia, the number of $\text{CD}34^+/\text{VEGFR}2^+$ cells was increased in blood of mice treated with NE, SKF-38393, and clenbuterol compared with control animals (Figure 2A). To evaluate the recruitment of BM-derived cells in ischemic tissue, we generated chimeric mice irradiated and transplanted with BM isolated from GFP animals. We showed that DA and NE increased by 30% and 43%, respectively, the number of GFP-positive cells in ischemic tissue compared with control animals (Figure 2B, $P < 0.01$; $P < 0.001$). Of interest, the number of cells with endothelial phenotype, ie, positive for both GFP and BSA-IB4, was also upregulated by 236% and 188% after DA and NE treatments, respectively (Figure 2C, $P < 0.01$; $P < 0.001$), suggesting that catecholamines may also control the ability of BM-derived cells to differentiate into cells with endothelial phenotype. To support this hypothesis, we first evaluated the cell surface expression of catecholamine receptor and then analyzed their role on the fate of cultured BM-derived cells.

Figure 4 (Continued). norepinephrine (NE), the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 (SKF), or the β_2 adrenergic receptor agonist clenbuterol (CLEN). Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS. **Top right,** representative flow cytometry scattergraph of 7/4-positive and Ly6G-negative cells in blood of mice treated with or without Dopamine (DA). Plots are gated on $\text{CD}11b^+$ cells. **B,** Infiltration of CD45-positive cells and that of 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocytes subsets in the ischemic muscles of control animals at different time points after the onset of ischemia. Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS.

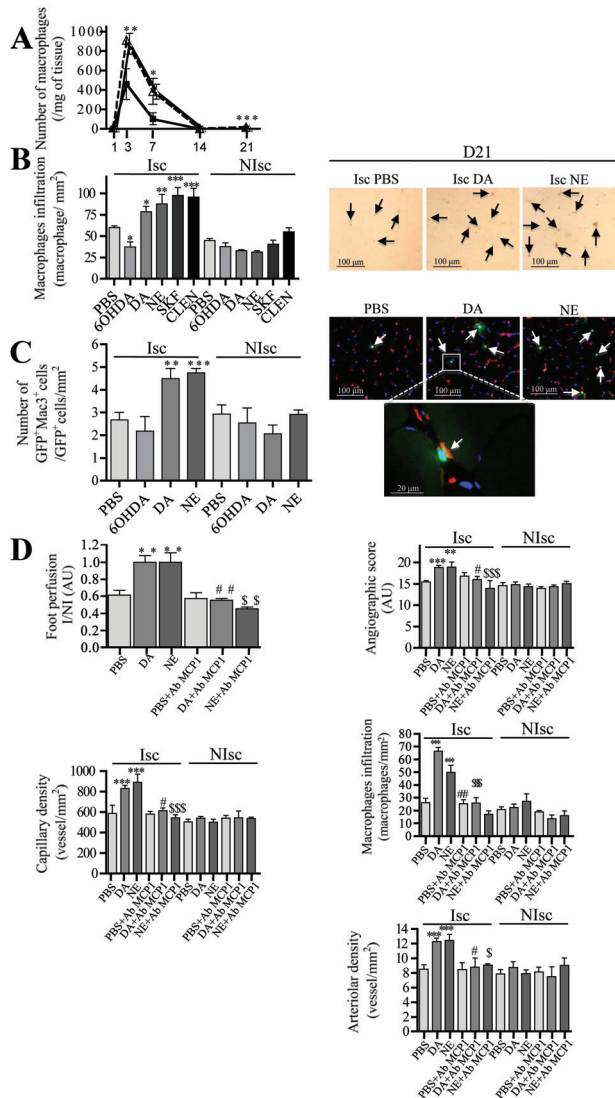


Figure 5. A, Macrophage number in the ischemic muscles of control animals at different time points after the onset of ischemia. Values are mean \pm SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs PBS. **B,** Quantification and representative photomicrographs of macrophage number 21 days after ischemia in muscle of mice treated with or without PBS, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), dopamine (DA), norepinephrine (NE), the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 (SKF), and the β_2 adrenergic receptor agonist clenbuterol (CLEN). Macrophages appear in brown, and arrows show Mac-3 positive macrophages. Values are mean \pm SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs PBS. **C,** Quantitative evaluation and representative photomicrographs of incorporated bone marrow (BM)-derived green fluorescent protein (GFP)⁺ Mac-3⁺ cells (GFP-positive cells appear in green and Mac-3-positive cells in red, and nuclei were stained blue with 4',6-diamidino-2-phenylindole) in chimeric mice treated with or without PBS, 6-OHDA, DA, or NE. Values are mean \pm SEM. ** P < 0.01 vs PBS. **D,** Quantitative evaluation of foot perfusion, angiographic score, capillary density, arteriolar density, and macrophage number in control animals and in mice receiving DA or NE with or without cotreatment with neutralizing antibody directed against the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (Ab MCP1). Isc indicates ischemic limbs; Nisc, nonischemic limbs. Values are mean \pm SEM. ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs PBS; # P < 0.05, ### P < 0.001 vs DA-treated mice; \$ P < 0.05, \$\$\$ P < 0.001 vs NE-treated animals.

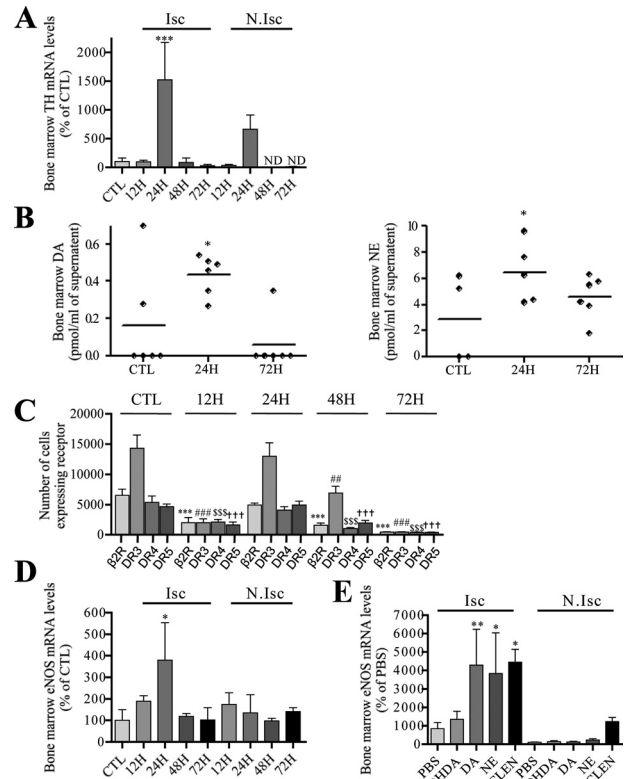


Figure 6. A, Tyrosine hydroxylase (TH) mRNA levels in bone marrow (BM) of ischemic (Isc) and nonischemic (N.Isc) limbs 12, 24, 48, and 72 hours after the onset of ischemia. CTL indicates sham-operated animals; ND, not detected. Values are mean \pm SEM. *** P < 0.001 vs CTL. **B,** Dopamine (DA) and norepinephrine (NE) levels in BM of ischemic limbs 24 and 72 hours after the onset of ischemia. Data are represented as mean \pm SEM. * P < 0.05 vs CTL. **C,** Percentage of BM cells expressing β_2 , D3, D4, or D5 receptors 12, 24, 48, and 72 hours after the onset of ischemia, assessed by fluorescence-activated cell sorting analysis. CTL indicates sham-operated animals. Values are mean \pm SEM. *** P < 0.001 vs the percentage of β_2 -positive cells in control animals; ### P < 0.01, ### P < 0.001 vs the percentage of D3-positive cells in control animals; \$\$\$ P < 0.001 vs the percentage of D4-positive cells in control animals; +++ P < 0.001 vs the percentage of D5-positive cells in control animals. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels in BM of Isc and N.Isc limbs, at different time point after the onset of ischemia (**D**) or after 3 days of treatment with or without 6-hydroxydopamine (6-OHDA), DA, NE, the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 (SKF), and the β_2 adrenergic receptor agonist clenbuterol (CLEN) (**E**). Values are mean \pm SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs CTL.

Flow cytometry analysis revealed that BMMNCs before and after 6 days of culture expressed β_2 , D3, D4, and D5 receptors on their surfaces and showed that DA and NE treatments did not affect catecholamine receptor levels (Figure 3A). Differentiation of BMMNCs into cells with endothelial phenotype, revealed by double-positive staining with DiI-labeled acetylated low-density lipoprotein and BSA-IB4 or with eNOS and BSA-IB4, was increased after DA, NE, SKF-38393, and clenbuterol treatments compared with non-treated cells (Figure 3B and 3C). Of interest, DA and NE are well-established activators of eNOS, and eNOS has been shown to control EPC differentiation.^{14,15,20,21} Nitric oxide synthase inhibitor treatment (L-NAME) blunted the increase

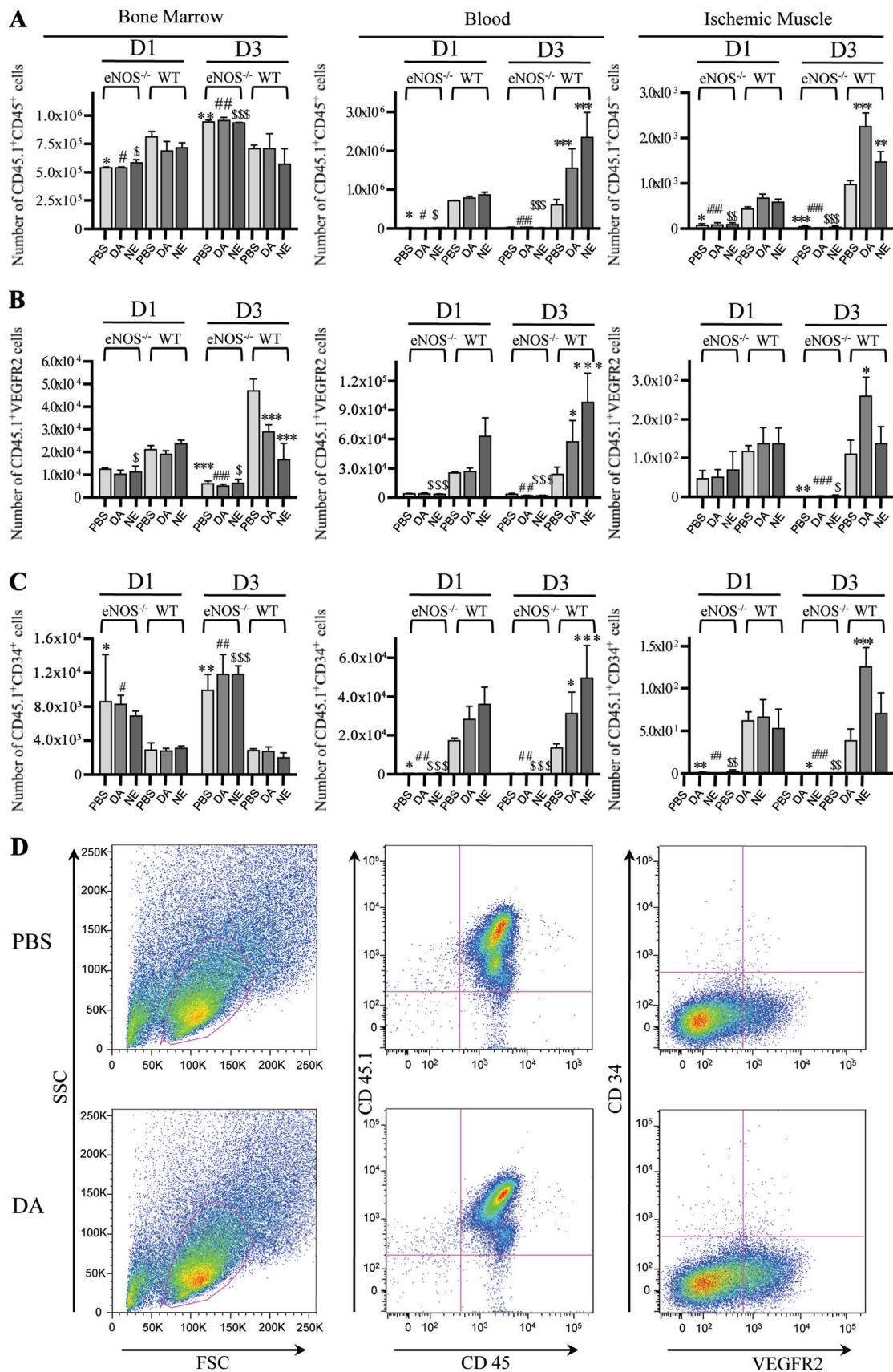


Figure 7. Quantitative and phenotypic analysis of CD45.1 BM-derived cells transplanted into lethally irradiated CD45.2 wild-type (WT) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-deficient animals. **A** to **C**, The number of CD45.1⁺/CD45⁺ (total number of cells), CD45.1⁺/vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), and CD45.1⁺/CD34⁺ cells was measured in the BM, the blood, and the ischemic muscle of chimeric CD45.2 WT and eNOS-deficient mice, 1 (D1) and 3 (D3) days after the onset of ischemia and treated

in the number of cells with endothelial phenotype, suggesting that eNOS activation was involved in the catecholamine-induced BM-derived cell differentiation (Figure 3B and 3C).

Of note, cultured BMMNC proliferation was enhanced by 2-fold after DA and NE treatments (Figure 3D, $P < 0.05$). After their recruitment to ischemic tissue, BM-derived cells are also capable of stimulating neovascularization by secretion of factors involved in tissue remodeling. To at least start to investigate this possibility, culture medium was collected from BMMNC differentiation cell cultures and assayed for VEGF and interleukin-10 contents. VEGF-A and interleukin-10 secretions were unchanged in culture medium from treated BMMNCs compared with control BMMNCs (Figure 3F and 3G). Finally, as proangiogenic effects of BMMNCs also rely on their ability to modulate vascular function, we assessed NO release by BMMNCs.^{17,18} NO production by catecholamine-treated BMMNCs was significantly elevated compared with control BMMNCs ($P < 0.05$, Figure 3E). Concordantly, NOS inhibitor treatment (L-NAME) inhibited the catecholamine-induced NO release.

Catecholamines and BM-Derived Cells With Inflammatory Cell Phenotype

Infiltration of inflammatory cells into ischemic tissue is a hallmark of ischemia and contribute to postischemic tissue remodeling.²² In mice treated with DA, NE, SKF-38393, and clenbuterol, the blood levels of CD45-positive cells were increased by ≈ 1.8 -fold over the PBS group, 3 days after ischemia. More specifically circulating $7/4^{\text{hi}}$ and $7/4^{\text{low}}$ monocytes number was increased by ≈ 2 - and 2.4-fold, respectively, in mice treated with catecholamines compared with controls (Figure 4A, $P < 0.05$). In the ischemic tissue, the number of CD45-positive cells raised between day 1 and day 3 and returned to basal levels at day 21 (Figure 4B). In particular, $7/4^{\text{hi}}$ and $7/4^{\text{low}}$ monocyte count peaked at day 3 following ischemia (Figure 4B). Interestingly, DA and NE increased this time-dependent monocyte infiltration (Figure 4B). Similarly, the number of macrophages rapidly increased after the onset of ischemia and completely faded between day 7 and day 14 (Figure 5A). Of note, macrophage number within the ischemic tissue was still enhanced by 82%, 110%, 80% and 70% after treatment with DA, NE, SKF-38393, and clenbuterol, respectively, 21 days after femoral artery ligation (Figure 5B). To determine whether infiltrated macrophages originate from BM, double-positive staining with GFP and Mac-3 was performed on muscle of BM GFP chimeric mice. The number of GFP and Mac-3-positive cells were upregulated by catecholamine administration (Figure 5C, $P < 0.01$).

Finally, to specifically unravel the role of BM-derived inflammatory cells in the catecholamine-related effects, we performed additional experiments using neutralizing antibody directed against the chemokine MCP-1. MCP-1 and its receptor CCR2 have been shown to play a key role in postischemic BM-derived inflammatory cell mobilization and

infiltration in ischemic tissues.²³ We showed that inhibition of MCP-1 signaling fully abrogated the catecholamine-related effects on postischemic vessel growth and macrophage number (Figure 5D).

Altogether, our results suggest that catecholamines control BM-derived cell mobilization and subsequently tissue regeneration.

Catecholamines Control BM-Derived Cell Egress Through Upregulation of Stromal eNOS

Quantitative polymerase chain reaction analysis of BM samples showed that tyrosine hydroxylase mRNA levels, the enzyme catalyzing the conversion of tyrosine into L-DOPA, the precursor of both DA and NE, were upregulated 24 hours after the onset ischemia and returned to basal levels thereafter (Figure 6A). Of interest, the regulation of tyrosine hydroxylase levels was associated with a raise in DA and NE contents, suggesting that ischemia activated the BM sympathetic nervous system (Figure 6B). BM-derived cells had variable expression of cell surface catecholamine receptors, depending on the time course after the onset of ischemia. Receptors levels were decreased 12 hours after ischemia and returned to basal levels 24 hours after ischemia. However, catecholamine receptor contents decreased again 48 and 72 hours after femoral artery ligation (Figure 6C).

Of interest, as for catecholamine synthesis, in the ischemic leg, BM eNOS mRNA levels were also increased by 280% at 24 hours after the onset of ischemia compared with control animals. It is noteworthy that eNOS mRNA contents were unchanged in the BM of nonischemic leg (Figure 6D). In addition, exogenous catecholamine treatment enhanced eNOS expression in the BM of ischemic leg, only (Figure 6E).

Overall, these results suggested that catecholamines may control eNOS expression in the BM and prompted us to investigate the role of eNOS regulation in catecholamine-induced mobilization and recruitment of BM-derived cells. To this end, we generated chimeric CD45.2 eNOS^{-/-} or WT mice lethally irradiated and retransplanted with BM derived cells from CD45.1 WT mice. In the absence of ischemia, the number of CD45.1⁺CD45.2⁺ cells was similar in eNOS^{-/-} and WT chimeric animals (data not shown). In the BM, the number of CD45.1⁺CD45⁺ and CD45.1⁺CD34⁺ cells was decreased by 1.3- and 3.3-fold, respectively, in WT chimeric mice compared with eNOS^{-/-} chimeric mice 3 days after ischemia, suggesting that eNOS deficiency reduced BM-derived cell mobilization from BM to blood (Figure 7A–7C). In addition, catecholamine administration reduced the number of BM cells positive for CD45.1 and VEGFR2 in WT chimeric mice but not in eNOS-deficient chimeric animals (Figure 7B). In the blood, 1 and 3 days after ischemia, the number of CD45.1⁺CD45⁺ cells or CD45.1⁺VEGFR2⁺ cells or CD45.1⁺CD34⁺ cells were higher in chimeric WT mice

Figure 7 (Continued). with or without dopamine (DA) and norepinephrine (NE). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs untreated chimeric WT mice (PBS); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs chimeric WT mice treated with DA, \$ $P < 0.05$; \$\$\$ $P < 0.01$; \$\$\$\$ $P < 0.001$ vs chimeric WT mice treated with NE. **D**, Representative flow cytometry scattergraph of CD45.1⁺/CD34⁺ and CD45.1⁺/VEGFR2⁺ BM-derived cells. Plots are gated on CD45.1-positive cells in the ischemic muscle of chimeric WT mice treated with or without DA.

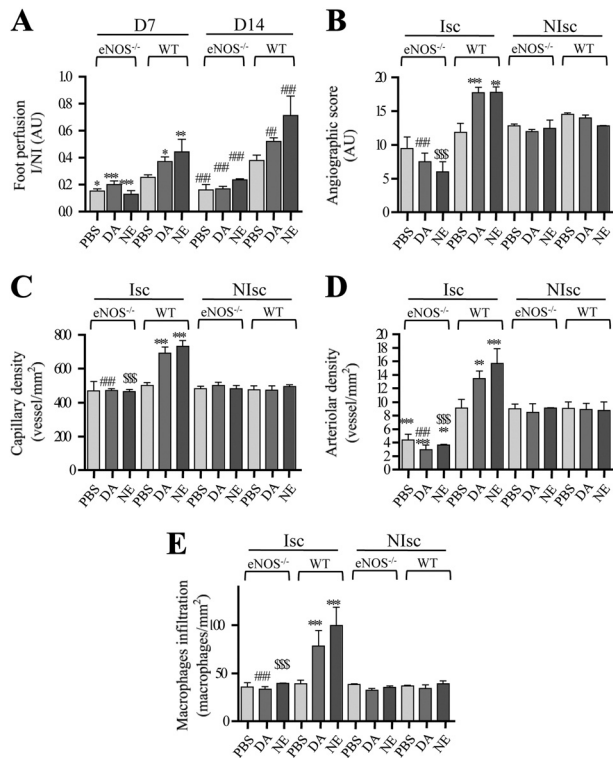


Figure 8. Quantitative evaluation of foot perfusion (A), microangiography (B), capillary density (C), arteriole density (D), and macrophage number (E) in ischemic wild-type (WT) or endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-deficient (eNOS^{-/-}) mice lethally irradiated and transplanted with BM isolated from WT animals. Isc indicates ischemic legs; Nisc, nonischemic legs. Data are presented as mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs untreated WT mice (PBS); ###*P* < 0.01; ####*P* < 0.001 vs WT mice treated with dopamine (DA); \$\$\$\$*P* < 0.001 vs WT treated with norepinephrine (NE).

compared with eNOS^{-/-} chimeric animals, and catecholamine treatments were not able to rescue the defective phenotype in eNOS-deficient animals (Figure 7). Similarly, in the ischemic muscle, the number of CD45.1⁺CD45⁺, CD45.1⁺VEGFR2⁺, or CD45.1⁺CD34⁺ cells was higher in chimeric WT compared with eNOS^{-/-} chimeric animals, and catecholamine treatments did not restore the recruitment of circulating cells in the ischemic area of eNOS^{-/-} animals (Figure 7). Together, these results showed that the lack of eNOS in the BM inhibited the mobilization and recruitment of BM-derived cells and suggested that eNOS controlled the catecholamine-related effect on mobilization and recruitment of BM cells. In line with these results, catecholamines were unable to stimulate postischemic inflammation and vessel growth in eNOS-deficient chimeric animals (Figure 8).

Discussion

In the present study, we showed that catecholamines modulate postischemic revascularization through stromal eNOS activation and regulation of BM-derived cell egress. Similarly, hematopoietic stem cell mobilization is severely altered in NE-deficient mice or after β -adrenergic antagonist administration, highlighting a key role of the sympathetic nervous system in this setting.⁸ In sharp contrast, BM DA has been reported to inhibit the mobilization of BM-derived EPCs

during malignant tumor growth through activation of D2 receptors.⁹ In our study, treatments with DA or with the D1/D5 receptor agonist SKF-38393 trigger BM-derived cell egress and postischemic vessel growth. In line with our results, D3/D5 receptor activation has been shown to enhance proliferation and motility of human CD34⁺ progenitor cells, repopulation of mouse BM, and egress of progenitor cells to circulation.¹⁰ It is noteworthy that D2 receptor blockade using eticlopride also stimulates BM-derived cell mobilization and triggers circulatory cells infiltration, as well as postischemic vessel growth (data not shown). Our study has broadened the understanding of the function of sympathetic nervous system in the regulation of the retention, proliferation, and recruitment of hematopoietic progenitor cells, demonstrating that β 2 adrenergic and D1/D5 receptor activate progenitor mobilization, whereas D2 receptor inhibits it.

Our results also demonstrate that there is a significant increase in tyrosine hydroxylase mRNA levels, which in turn is correlated with upregulation in the concentration of BM DA and NE, suggesting that limb ischemia triggers catecholamines synthesis within the BM. However, both nerve cells and other cells may release catecholamines in the BM.^{24,25} Of interest, whatever the type of catecholamine-producing cells, these effects were observed in the BM of ischemic legs only. In addition, we have also shown that DA and NE treatments enhance BM eNOS mRNA levels and that eNOS-related pathways are required for catecholamine-induced progenitor cell mobilization from BM. In previous studies, eNOS has been identified as a specific mediator of progenitor cell mobilization from the BM to circulation.³ Similarly, in eNOS-null mice, the effect of estradiol on mobilization of EPCs was lost, as was the functional improvement in recovery from acute myocardial ischemia.⁴ Nevertheless, it is also likely that DA and NE can activate BM progenitor cell mobilization through alternative pathways, including Wnt signaling and upregulation of β -catenin abundance.¹⁰

We also unravel important function for neurotransmitters in regulating 2 additional key processes of postischemic revascularization: recruitment to ischemic tissues and differentiation. When stimulated by neurotransmitters of the adrenergic system, the number of BM-derived cells recruited to ischemic area was markedly increased. Likewise, NE and DA has been shown to increase the motility and the migration potential of immature CD34⁺ cells through activation of MT1-MMP or MMP2.¹⁰ Finally, our data have demonstrated an important and direct function for the nervous system in regulating the differentiation of BM cells to cells with endothelial phenotype. Cultured BMMNCs expressed receptor for DA and NE and catecholamine-induced NO release controls BM cell differentiation. Of interest, DA and NE are well-established activators of eNOS, and eNOS has been shown to control EPC differentiation.^{14,15,20,21}

In diabetes, EPCs were shown trapped within the diabetic BM as a result of a lack of inherent sympathetic denervation that can alter circadian release of EPCs from the BM capacity.²⁴ Our novel findings would indicate that catecholamines or β 2 and D1/D5 agonists could be interesting treatments to restore physiological EPC egress from the BM and improved vascular repair in pathological tissues.

Whereas our work unravels the role of catecholamines on BM-derived cell mobilization, we cannot rule out the implication of other mechanisms. Hence, it has been previously demonstrated that in vivo adenoviral-mediated gene transfer of the human β_2 adrenergic receptor to the endothelium of the rat femoral artery improves angiographic score, hindlimb perfusion, and capillary density.¹² In addition, stimulation of endogenous and overexpressed β_2 adrenergic receptor on endothelial cells in vitro was found to regulate cell number by inducing proliferation and [³H]thymidine incorporation through means of extracellular receptor-activated kinase and vascular endothelial growth factor or activation of nuclear factor- κ B.^{12,13}

In summary, we show here that the sympathetic nervous system regulates, through eNOS signaling, the egress of BM-derived vascular progenitor cells and BM-derived inflammatory cells, leading to activation of postischemic vessel growth. Our study also suggests that regulation of sympathetic nervous system activation may constitute an innovative strategy to modulate BM-derived cell mobilization and vessel growth in cancer or cardiovascular ischemic diseases.

Sources of Funding

Dr Silvestre is supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Agence Nationale de la Recherche Chem-repair (2010-BLAN112702) and Fondation Leducq Transatlantic Network (09-CVD-01). Dr Silvestre is also a recipient of a Contrat d'Interface from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Dr Réalde is a recipient of fellowships from Fondation pour la Recherche Médicale and from Domaine D'Intérêt Majeur Cardiovasculaire Obésité Diabète.

Disclosures

None.

References

- Dimmeler S. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1088–1093.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002;109:625–637.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9:1370–1376.
- Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation.* 2003;108:3115–3121.
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Mische E, Bohm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004;109:220–226.
- Yu J, deMuinck ED, Zhuang Z, Drinane M, Kausar K, Rubanyi GM, Qian HS, Murata T, Escalante B, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:10999–11004.
- Hasko G, Szabo C. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. *Biochem Pharmacol.* 1998;56:1079–1087.
- Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell.* 2006;124:407–421.
- Chakroborty D, Chowdhury UR, Sarkar C, Baral R, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *J Clin Invest.* 2008;118:1380–1389.
- Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, Azaria Y, Resnick I, Hardan I, Ben-Hur H, Nagler A, Rubinstein M, Lapidot T. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol.* 2007;8:1123–1131.
- Chalothorn D, Zhang H, Clayton JA, Thomas SA, Faber JE. Catecholamines augment collateral vessel growth and angiogenesis in hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H947–H959.
- Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Galasso G, Campanile A, Santulli G, Cipolletta E, Cerullo V, Cimini V, Altobelli GG, Piscione F, Priante O, Pastore L, Chiariello M, Salvatore F, Koch WJ, Trimarco B. Ischemic neoangiogenesis enhanced by β_2 -adrenergic receptor overexpression: a novel role for the endothelial adrenergic system. *Circ Res.* 2005;97:1182–1189.
- Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Santulli G, Fusco A, Zhou RH, Eckhart AD, Poppel K, Koch WJ, Trimarco B, Iaccarino G. Impaired neoangiogenesis in β -adrenoceptor gene-deficient mice: restoration by intravascular human β -adrenoceptor gene transfer and role of NF κ B and CREB transcription factors. *Br J Pharmacol.* 2011;162:712–721.
- Seya Y, Fukuda T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K. Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2006;553:54–60.
- Pyne-Geithman GJ, Caudell DN, Cooper M, Clark JF, Shutter LA. Dopamine D2-receptor-mediated increase in vascular and endothelial NOS activity ameliorates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in vitro. *Neurocrit Care.* 2009;10:225–231.
- Silvestre JS, Thery C, Hamard G, Boddaert J, Aguilar B, Delcayre A, Houbroun C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Levy B, Tedgui A, Amigorena S, Mallat Z. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med.* 2005;11:499–506.
- You D, Waeckel L, Ebrahimian TG, Blanc-Brude O, Foubert P, Barateau V, Duriez M, Lericousse-Roussanne S, Vilar J, Dejana E, Tobelem G, Levy BI, Silvestre JS. Increase in vascular permeability and vasodilation are critical for proangiogenic effects of stem cell therapy. *Circulation.* 2006;114:328–338.
- Mees B, Recalde A, Loinard C, Tempel D, Godinho M, Vilar J, van Haperen R, Levy B, de Crom R, Silvestre JS. Endothelial nitric oxide synthase overexpression restores the efficiency of bone marrow mononuclear cell-based therapy. *Am J Pathol.* 2011;178:55–60.
- Bonnefont-Rousselot D, Mahmoudi A, Mougnot N, Varoquaux O, Le Nahour G, Fouret P, Lechat P. Catecholamine effects on cardiac remodeling, oxidative stress and fibrosis in experimental heart failure. *Redox Rep.* 2002;7:145–151.
- Loomans CJ, Wan H, de Crom R, van Haperen R, de Boer HC, Leenen PJ, Drexhage HA, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ, Staal FJ. Angiogenic murine endothelial progenitor cells are derived from a myeloid bone marrow fraction and can be identified by endothelial nitric synthase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1760–1767.
- Li X, Han Y, Pang W, Li C, Xie X, Shyy JY, Zhu Y. AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1789–1795.
- Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A, Levy BI. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2008;78:242–249.
- Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Recalde A, Richart AL, Loinard C, Zouggar Y, Guerin C, Duriez M, Combadiere B, Poupel L, Levy BI, Mallat Z, Combadiere C, Silvestre JS. Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2010;88:186–195.
- Busik JV, Tikhonenko M, Bhatwadekar A, Opreanu M, Yakubova N, Caballero S, Player D, Nakagawa T, Afzal A, Kielczewski J, Sochacki A, Hasty S, Li Calzi S, Kim S, Duclax SK, Segal MS, Guberski DL, Esselman WJ, Boulton ME, Grant MB. Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock. *J Exp Med.* 2009;206:2897–2906.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoun FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoessel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature.* 2007;449:721–725.

II. Article 2 : Homeostatic and Tissue Repair Defaults in Mice Carrying Selective Genetic Invalidation of CXCL12/Proteoglycan Interactions

Circulation. 2012 Oct 9;126(15):1882-95

Patricia Rueda*, Adèle Richart*, Alice Récalde*, Pamela Gasse, José Vilar, Coralie Guérin, Hugues Lortat-Jacob, Paulo Vieira, Françoise Baleux, Fabrice Chrétien, Fernando Arenzana-Seisdedos, Jean-Sébastien Silvestre. (*co-1^{er} auteurs)

Les chimiokines sont connues pour leurs capacités à attirer des cellules en se liant à des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G. Elles possèdent également un domaine de liaison aux glycosaminoglycanes (GAG) qui leur permet d'adhérer à la matrice extracellulaire, de limiter leur diffusion dans la circulation sanguine et de former un gradient chimioattractant qui favorise la migration cellulaire. Toutefois, l'effet de ces interactions chimiokines/GAG sur leurs fonctions biologiques reste encore mal décrit. CXCL12, connue pour moduler la migration cellulaire via son récepteur CXCR4, présente un domaine de liaison aux héparan-sulfates (HS) structurellement bien séparé du domaine de liaison à CXCR4. De plus, les trois isoformes murines de CXCL12 (CXCL12 α , CXCL12 β et CXCL12 γ) ont les mêmes capacités à se lier et à activer CXCR4 mais présentent une affinité pour les HS différentes. En effet, CXCL12 α a un seul domaine de liaison aux HS alors que CXCL12 γ possède, en plus de la totalité de la séquence de CXCL12 α , une chaîne C-terminale supplémentaire contenant quatre domaines de liaison aux HS. Il a d'ailleurs été montré que CXCL12 γ permet un meilleur recrutement *in vitro* de cellules CXCR4+ par rapport à CXCL12 α ^{125 126}. Ainsi, CXCL12 est

un excellent modèle pour étudier spécifiquement le rôle des interactions chimiokine/GAG dans leurs fonctions biologiques.

Ce deuxième travail s'est donc intéressé à l'importance des interactions CXCL12/HS dans les processus de revascularisation post-ischémique.

- **Les souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* ont un défaut de revascularisation post-ischémique**

Afin d'étudier l'importance des interactions CXCL12/HS, nous avons créé une souris mutante (*Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}*) dont le domaine de liaison aux HS commun aux trois isoformes a été invalidé et la chaîne C-terminale de l'isoforme CXCL12 γ tronquée. Ainsi, toutes les molécules CXCL12 exprimées dans ces souris ont des capacités d'adhésion aux HS fortement amoindries ; leurs capacités à se lier et à activer CXCR4 étant préservées. Ces souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* sont viables, fertiles, ne présentent pas d'anomalies anatomiques ou histologiques, ont le même niveau d'expression basale d'ARNm des trois isoformes, mais présentent un taux plasmatique de CXCL12 élevé.

Nous avons montré que dans un contexte d'ischémie induite du membre inférieur, ces souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* présentent toutefois un défaut de revascularisation post-ischémique. En effet, 21 jours après la ligature de leur artère fémorale, le nombre de capillaires et d'artérioles, le score angiographique ainsi que la perfusion sanguine de leurs pattes ischémiques sont nettement inférieurs à ceux des souris contrôles. Les cinétiques d'expression des ARNm des trois isoformes sont similaires chez les souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* et contrôles, avec un pic d'expression au 6^{ème} jour suivant l'ischémie. L'expression protéique de CXCL12 est également identique chez les souris mutées avec une localisation au niveau des structures vasculaires. Les souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* se distinguent donc des souris contrôles uniquement de par leur défaut d'interactions entre CXCL12 et les HS, ce qui souligne leurs importances pour la fonction biologique de CXCL12.

- **Les interactions CXCL12/HS favorisent le recrutement des cellules médullaires**

Le deuxième résultat majeur de ce travail révèle que, tout comme l'axe CXCL12/CXCR4, les interactions CXCL12/HS modulent le recrutement des cellules circulantes dans le tissu ischémique. En effet, 6 jours après l'induction de l'ischémie, nous avons trouvé par immuno-histochimie moins de macrophages dans le muscle lésé des souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* par rapport aux souris contrôles. Au même temps, une analyse plus fine par cytométrie en flux nous a également permis d'observer chez nos souris mutées une augmentation dans le sang et une diminution dans le muscle ischémique du nombre de cellules CD45+CD34+, relevant ainsi un défaut de recrutement des progéniteurs médullaires depuis la circulation sanguine vers le tissu ischémique. De façon intéressante, nous n'avons pas constaté de différence du nombre totale de cellules CD45+ dans le sang ou le tissu ischémique.

- **CXCL12 γ promeut la revascularisation post-ischémique**

Grâce aux différentes isoformes de CXCL12 nous avons pu analyser l'effet du degré d'affinité d'une molécule pour les HS sur sa fonction biologique. Pour cela nous avons choisi de comparer CXCL12 α , isoforme ayant un seul domaine de liaison aux HS, à CXCL12 γ , isoforme qui grâce à sa chaîne C-terminale a une très forte affinité pour les HS. Des souris ayant une ischémie périphérique ont donc été traitées par électrotransfert avec des plasmides contenant soit CXCL12 α , soit CXCL12 γ . Les deux isoformes favorisent la revascularisation post-ischémique, mais l'effet induit par CXCL12 γ est significativement plus élevé que CXCL12 α . Les capacités de CXCL12 γ à promouvoir la revascularisation post-ischémique résultent bien de son affinité pour les HS puisque cet effet est complètement aboli lorsque les souris sont traitées avec un CXCL12 γ dont les domaines de liaison aux HS ont été invalidés (CXCL12 γ m2). L'analyse immuno-histochimique des muscles ischémiques a permis de montrer que CXCL12 γ permet un meilleur recrutement des cellules d'origine médullaire par

rapport à CXCL12 α . Toutefois, les proportions de macrophages et de cellules à phénotype endothéliale provenant de la moelle osseuse sont similaires dans les deux traitements, suggérant que CXCL12 γ ne favorise pas le recrutement d'un type cellulaire en particulier mais module le recrutement de l'ensemble des cellules d'origine médullaire dans le tissu ischémique.

Enfin, nous avons montré que traiter nos souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* avec uniquement l'isoforme CXCL12 γ suffit à restaurer leur phénotype et à obtenir une revascularisation comparable aux contrôles.

Ce travail a permis de mettre en évidence que les interactions CXCL12/HS sont déterminantes pour les fonctions biologiques de CXCL12 dans la revascularisation post-ischémique.

Homeostatic and Tissue Reparation Defaults in Mice Carrying Selective Genetic Invalidation of CXCL12/Proteoglycan Interactions

Patricia Rueda, Adèle Richart, Alice Récalde, Pamela Gasse, José Vilar, Coralie Guérin, Hugues Lortat-Jacob, Paulo Vieira, Françoise Baleux, Fabrice Chretien, Fernando Arenzana-Seisdedos and Jean-Sébastien Silvestre

Circulation. 2012;126:1882-1895; originally published online October 3, 2012;
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.113290

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/126/15/1882>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2012/10/03/CIRCULATIONAHA.112.113290.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Homeostatic and Tissue Repair Defaults in Mice Carrying Selective Genetic Invalidation of CXCL12/Proteoglycan Interactions

Patricia Rueda, PhD*; Adèle Richart, MSc*; Alice Récalde, PhD*; Pamela Gasse, PhD; José Vilar, PhD; Coralie Guérin, MSc; Hugues Lortat-Jacob, PhD; Paulo Vieira, PhD; Françoise Baleux, PhD; Fabrice Chretien, MD, PhD; Fernando Arenzana-Seisdedos, MD*; Jean-Sébastien Silvestre, PhD*

Background—Interaction with heparan sulfate proteoglycans is supposed to provide chemokines with the capacity to immobilize on cell surface and extracellular matrix for accomplishing both tissue homing and signaling of attracted cells. However, the consequences of the exclusive invalidation of such interaction on the roles played by endogenous chemokines *in vivo* remain unascertained.

Methods and Results—We engineered a mouse carrying a *Cxcl12* gene (*Cxcl12^{Gagtm}*) mutation that precludes interactions with heparan sulfate structures while not affecting CXCR4-dependent cell signaling of CXCL12 isoforms (α , β , γ). *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* mice develop normally, express normal levels of total and isoform-specific *Cxcl12* mRNA, and show increased counting of circulating CD34⁺ hematopoietic precursor cells. After induced acute ischemia, a marked impaired capacity to support revascularization was observed in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals associated with a reduced number of infiltrating cells in the ischemic tissue despite the massive expression of CXCL12 isoforms. Importantly, exogenous administration of CXCL12 γ , which binds heparan sulfate with the highest affinity ever reported for a cytokine, fully restores vascular growth, whereas heparan sulfate-binding CXCL12 γ mutants failed to promote revascularization in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals.

Conclusion—These findings prove the role played by heparan sulfate interactions in the functions of CXCL12 in both homeostasis and physiopathological settings and document for the first time the paradigm of chemokine immobilization *in vivo*. (*Circulation*. 2012;126:1882-1895.)

Key Words: angiogenesis-modulating agents ■ chemokine CXCL12 ■ chemokines ■ ischemia ■ proteoglycans

Chemokines control the migration of a large array of cells, thus regulating function and homeostasis of a number of tissues. Glycosaminoglycans (GAGs), the glycanic moiety of proteoglycans, are considered the critical biological structure that determines the immobilization of chemokines on the extracellular matrix and cell surfaces. Immobilization provides chemokines with a robust anchoring against blood flow and, by restraining their diffusion, facilitates both the formation of local gradients and the synchronous coordination of motility and cell adhesion.¹⁻³

Clinical Perspective on p 1895

Among GAGs, chemokines bind preferentially to heparan sulfate (HS) through interactions of either canonical BBXB

and BBBXXB (B, basic; X, any residue) or discontinuous cationic protein epitopes with the negatively charged sulfated residues of HS.⁴ Although chemokine binding to GAGs has been well described from a biochemical point of view, the functional aspects of these interactions remain poorly understood, and *in vivo* investigations to address the importance of chemokine-GAG interactions are limited. In some cases, the experimental approach, eg, the administration of sulfated glycans competing exclusively with HS⁵ or the genetic interference selectively inhibiting endothelial HS biosynthesis,⁶ has broad effects and would affect, beyond chemokines, the interaction of GAGs with many other factors. In other

Received April 25, 2012; accepted August 30, 2012.

From the Institut Pasteur, Unité de Pathogénie Virale, Département de Virologie, INSERM U819, Paris (P.R., P.G., F.A.-S.); INSERM UMRS 970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris (A.R., A.R., J.V., C.G., J.-S.S.); Université Paris Descartes, Sorbonne Paris cité, Paris (A.R., A.R., J.V., C.G., J.-S.S.); CEA, CNRS, Université Joseph Fourier–Grenoble 1, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, Grenoble (H.L.-J.); Institut Pasteur, Unité de Lymphopoïèse, INSERM U688, Paris (P.V.); Institut Pasteur, Unité de Chimie des Biomolécules, Centre National de la Recherche Scientifique 2128, Paris (F.B.); Institut Pasteur, Unité Histopathologie Humaine et Modèles Animaux, Département Infection et Epidémiologie, Paris (F.C.); and Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, Faculté de Médecine, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Raymond Poincaré, Paris (F.C.), France.

*Drs Rueda, Richart, and Récalde and Drs Arenzana-Seisdedos and Silvestre contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.113290/-DC1>.

Correspondence to Fernando Arenzana-Seisdedos, MD, INSERM U819, Unité de Pathogénie Virale, Département de Virologie, Institut Pasteur, 28, Rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex, France.

© 2012 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.113290

cases, the overlapping or spatial proximity of chemokine domains involved in receptor-mediated cell signaling and GAG attachment has obscured the interpretation and significance of results obtained by exogenous administration of GAG-binding mutant chemokines with reduced agonist capacity.⁷

In this regard, CXCL12 is unique among chemokines for the spatial separation between the receptor and HS-binding sites, localized on the opposite sides of the molecule,⁸ thus permitting the evaluation of the contribution of each domain to their biological functions.

In mice, 3 isoforms (CXCL12 α , CXCL12 β , and CXCL12 γ), which show an exceptional degree of interspecies conservation exceeding 95% homology for their amino acid sequences, are generated by alternative splicing.^{9,10} CXCL12 β and CXCL12 γ contain the entire amino acid sequence (68Aa) of CXCL12 α , which encompasses the CXCR4-binding domain and the protein core BBXB motif (K24H25L26K27) critically required for the HS binding. CXCL12 β (72Aa) and CXCL12 γ (98Aa) differ from CXCL12 α by the addition of the last 4 and 30 Aa, respectively, encoding 1 and 4 additional BBXB motifs. Although CXCL12 α and CXCL12 β display affinities for HS or heparin in the same range of magnitude (K_d =93 and 25 nmol/L, respectively), that of CXCL12 γ is 1.5 nmol/L and constitutes the strongest HS affinity ever measured for a cytokine.^{11,12} This firm interaction with HS relies on the cooperation of the core and the high cationic C-ter domain of the chemokine in which the 4 overlapping BBXB motifs of CXCL12 γ mostly account for the slow off-rates from immobilized HS.¹²

We reported previously that neutralization of the K24H25L26K27 cationic charge (K24S and K27S substitutions) is sufficient to drastically reduce binding to HS and complexing of CXCL12 α with either immobilized heparin or HS.^{11–14} Similarly, O'Boyle et al¹⁵ recently reported that combined K24S and K27S in CXCL12 β are sufficient to impede HS binding of this isoform on the apical surface of endothelial cells and promote a dramatic blood and delayed clearance compared with the wild-type (WT) counterpart. To abrogate HS binding of CXCL12 γ , the mutation of K24H25L26K27 combined with the C-ter 4-overlapping BBXB motifs is required.^{12,13} Of note, although all these HS-binding CXCL12 mutants show a preserved global structure defined by nuclear magnetic resonance^{11,12} and are full CXCR4 agonists in vitro,^{10–13,15} they have only a marginal capacity to attract leukocytes or endothelial progenitor cells in vivo and are unable to immobilize and localize properly on GAG structures.^{13,15} Importantly, CXCL12 HS-binding mutants induce homologous CXCR4 desensitization, thus neutralizing the chemoattractant properties of CXCL12 WT molecules.¹⁵

CXCL12 binds both CXCR4 and CXCR7,^{16–19} is the only cognate ligand of CXCR4, and plays essential and nonredundant roles in organogenesis.^{20,21} CXCL12 is widely expressed by mesothelial cells, epithelial cells, endothelial cells, and osteoblasts, as well as bone marrow (BM) stromal cells.^{22–24} It acts in postnatal life as a key chemoattractant for hematopoietic progenitor cells and leukocytes^{16,17,24} and regulates the BM homing and retention/egress of hematopoietic

cells,^{25,26} as well as the basal trafficking and transendothelial migration of leukocytes.^{27–29} Aside from homeostasis, CXCL12 is involved in both tumorigenesis and cancer metastasis³⁰ and is a pathogenic factor in systemic disease like rheumatoid arthritis in which it shows proangiogenic and inflammatory effects.³¹ In addition, CXCL12 plays a role of paramount importance as an essential and nonredundant factor involved in tissue remodeling, particularly in vascular regeneration.³²

Overall, the structural characteristics and pleiotropic roles played by CXCL12 make it ideally suited for investigating how the interactions with GAG/HS modulate the biological role of a chemokine in vivo. To this aim, we engineered a transgenic mouse expressing a *Cxcl12* gene in which the critical sequences encoding CXCL12 domains involved in HS binding are selectively invalidated while the CXCR4 agonist potency and efficiency of the mutant proteins are preserved intact. The mutant mice show enhanced serum levels of free CXCL12 and an increased number of circulating leukocytes and CD34⁺ hematopoietic cells.⁵ Strikingly, and in keeping with the essential role played by CXCL12 in tissue repair, these mice display a dramatically reduced capacity to regenerate vascular growth after acute ischemia that is recovered by expression of WT CXCL12, demonstrating the importance of GAG binding for proper in vivo function. To the best of our knowledge, this is the first description of an animal model in which the HS-binding capacities of an endogenous chemokine were genetically invalidated and the consequences of the selectively impaired function were investigated in both homeostasis and physiological settings.

Methods

Experiments were conducted according to the French veterinary guidelines and those formulated by the European Community for experimental animal use (L358-86/609EEC).

Chemokines: cDNA Expression Vectors and Synthesis

Tissues were obtained by dissection of *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice or WT littermates previously euthanized. BM was recovered from right tibias by the flushing procedure with 5 mL PBS. Total RNAs were purified with the RNeasy Kit (Qiagen), and *Cxcl12* cDNAs were synthesized with 0.5 μ g of the corresponding RNAs with random hexamer. The isoform-specific *Cxcl12* cDNAs corresponding to WT and *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice were generated as described previously¹³ using the *Cxcl12* primers: forward common, 5'-caccatggacgccaaggtcgtcgcc-3'; and reverse, 5'-ttactgttttaagctttccaggtta-3', 5'-tcacatcttgagcctctgttttaagc-3', and 5'-ctagtgtttctttctgggcagcc-3' for *Cxcl12* α , *Cxcl12* β , and *Cxcl12* γ , respectively.

The coding CXCL12 γ m2 DNA was derived by mutagenesis from the WT sequence. All of them were subcloned in a cytomegalovirus promoter-driven pcDNA3 expression vector (Invitrogen). HEK293 cells were transfected with CXCL12 expression vectors to generate CXCL12-containing cell supernatants. Chemically synthesized chemokines were generated and evaluated for their purity and concentration as previously described.¹¹

Cxcl12 Knock-In and Cxcl12^{Gagtm} Mouse Generation

For animal engineering (iTL, Fresh Meadows, NY; Dr Ailan Lu), a 14.5-kb genomic DNA was used to construct the targeting vector first subcloned from a positively identified C57BL/6 BAC clone.

The AAG>TCG and AAA>TCT (aa: K>S) mutations within exon 2 and the stop codon TAG insertion in exon 4, which selectively prevents translation of CXCL12 γ last 30Aa, were generated by 3-step polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis. The PCR fragments carrying mutations were then used to replace the WT sequence using conventional subcloning methods. The long homology arm extends ≈ 6.6 kb 5' to the first set of mutations in exon 2. The LoxP/FRT-Neo cassette was inserted ≈ 2.2 kb downstream of the first set of mutations and ≈ 2.3 kb upstream of the second set of mutations (stop codon insertion in exon 4) in intron 3 to 4. The short homology arm extends 3.3 kb 3' to the second set of mutations. The targeting vector (backbone; a 2.4-kb pSP72-based vector) was validated by restriction analysis and sequencing after each modification. Targeting vector (10 μ g) was linearized by *Cla*I digestion and then transfected by electroporation of BA1 (C57BL/6 \times 129/SvEv) hybrid embryonic stem cells. After selection with G418 antibiotic, surviving clones were expanded for PCR analysis to identify recombinant embryonic stem cell clones, and a secondary confirmation of positive clones identified by PCR was performed by Southern blot analysis. Targeted BA1 (C57BL/6 \times 129/SvEv) hybrid embryonic stem cells were microinjected into C57BL/6 blastocysts. Resulting chimeras with a high percentage of agouti coat color were mated to WT C57BL/6 mice to generate F1 *Cxcl12*^{Gagtm/wt} offspring. Tail DNA was analyzed by PCR to confirm the integration of the desired sequences. The obtained *Cxcl12*^{Gagtm/wt} mice were crossed with transgenic 129sv PGK-Cre for LoxP/FRT-Neo cassette excision. Offspring that do not inherit PGK-CRE and delete LoxP/FRT-Neo cassette were selected, and the colony was amplified. Genotypes of mice encoding *Cxcl12*^{Gagtm} on excision of Neo cassette were identified by PCR with 5'tgccagcataaagacactcgc3' (forward) and 5'cagcccttgaagtaactcactgc (reverse) 3' primers.

Characterization of *Cxcl12* mRNA and Protein Expression in Normal and Ischemic Tissues

For quantitative real-time PCR, cerebellum, brain, thymus, heart, and skeletal muscle tissues were obtained by dissection of *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice or WT littermates. BM was recovered from right tibias by the flushing procedure with 5 mL PBS. Total RNAs were purified with the Rneasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and cDNAs were synthesized with 0.5 μ g of the corresponding RNAs with random hexamer. Quantitative real-time PCR was performed on a Mix3005Tm QPCR System with MxPro QPCR Software 3.00 (Stratagene, La Jolla, CA) and the SYBR Green detection system using the forward common primer 5'tgcccttcagat-tgttgac3' and the reverse primers 5'ccacggatgcagccttc3', 5'ctt-gagcctctgtttaagctt3', and 5'gctagcttacaagcgcagagcagcgact-cgc3' for *Cxcl12* α , *Cxcl12* β , and *Cxcl12* γ , respectively. Mouse Hprt and GAPDH genes were used as controls. Quantitative analysis was then performed by use of the Livak method.

For evaluating CXCL12 accumulation and localization in muscle, frozen sections (7 μ m) were incubated with CXCL12 K15C (10 μ g/mL) monoclonal antibody, FITC-Griffonia simplicifolia agglutinin isolectin B4 (1:100; Sigma), and rabbit anti-mouse α -smooth muscle actin (1:100; Abcam) at room temperature. Finally, sections were incubated with DAPI (1:10 000; Sigma). Alexa Fluor 594 (1:100; Invitrogen) and Cy5-labeled secondary antibodies (1:200; Jackson ImmunoResearch) were then used to reveal CXCL12 and α -actin-positive stainings, respectively.

Quantification of CXCL12 in mice blood serum was carried out with the DuoSet ELISA development kit for mouse CXCL12 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Blood was collected by cardiac puncture.

Cell Surface Binding Potential and Chemotaxis Assay

Evaluation of synthetic CXCL12 chemokines adsorption on cell surfaces of CHO GAG-expressing cells and chemotaxis assay (human CD4⁺ T lymphocytes or human endothelial progenitor cells [EPCs]) were performed as described previously.^{11,13} EPCs were

isolated from human umbilical cord blood and differentiated ex vivo as previously described.³³

Peripheral Blood Analysis

WT and *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice (n=10) were killed, and blood was collected as described above and transferred to EDTA-pretreated tubes (Sarstedt). Then, 20 μ L sample was collected with the disposable diluting pipette system of the BD Unopette procedure (BD, Franklin Lakes, NJ). Cells were stained with the Gr1-FITC, CD4-PB, and CD34-PE antibodies or the matching control isotypes and analyzed in a BD Canto Flow Cytometer fluorescence-activated cell sorter (BD Bioscience). Erythrocytes and thrombocytes were quantified by flow cytometry (Siemens ADVIA 120).

Experimental Model of Surgically Induced Hind-Limb Ischemia

Induction of Ischemia and Plasmid Electrotransfer

Cxcl12^{Gagtm/Gagtm} mice and their WT C57BL/6 littermates underwent surgical ligation of the proximal part of the right femoral artery above the origin of the circumflexa femoris lateralis. Expression plasmids (50 μ g) encoding for CXCL12 α , CXCL12 γ , or CXCL12 γ m2 were then injected into both tibial anterior and gastrocnemius muscles of the anesthetized mouse as previously described.³⁴ Transcutaneous electric pulses (8 square-wave electric pulses of 200 V/cm, 20 milliseconds each, at 2 Hz) were delivered by a PS-15 electropulsator (Jouan) using 2 stainless steel plate electrodes placed 4.2 to 5.3 mm apart on each side of the leg. The left leg was not ligated or electrotransferred and was used as an internal control. In additional set of experiments, C57BL/6 mice with surgically induced hind-limb ischemia and treated with expression plasmids also received intravenous injection of 1×10^5 human EPCs.

Analysis of Neovascularization

Postischemic neovascularization was evaluated by 3 different methods, as previously described.³⁴

Microangiography

Mice were anesthetized (pentobarbital) and longitudinal laparotomy was performed to introduce a polyethylene catheter into the abdominal aorta and to inject contrast medium (1 g/mL barium sulfate). Angiography of hind limbs was then performed, and images (2 per animals) were acquired with a high-definition digital x-ray transducer. Images were assembled to obtain a complete view of the hind limbs.

Capillary and Arteriole Density Analysis

Frozen tissue sections (7 μ m) from calf muscle were incubated with rabbit polyclonal antibody directed against total fibronectin (1:50 dilution; Abcys) to identify capillaries and rabbit anti-mouse α -smooth muscle actin (1:100 dilution; Abcam) to identify arterioles. The capillary-to-myocytes ratio was determined in both ischemic and nonischemic legs.

Laser Doppler Perfusion Imaging

Briefly, excess hairs were removed by depilatory cream from the limb, and mice were placed on a heating plate at 37°C to minimize temperature variation. Nevertheless, to account for variables, including ambient light, temperature, and experimental procedures, perfusion was calculated in the foot and expressed as a ratio of ischemic to nonischemic legs.

Analysis of Cell Infiltration in the Ischemic Tissue

To evaluate the number of infiltrating CD45.1-positive cells, 10^7 mononuclear cells isolated from the BM of CD45.1 mice were intravenously injected to *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice and their WT C57BL/6 littermates 1 day after femoral artery ligation. Five days after the injection, the ischemic gastrocnemius muscles were harvested, weighed, minced, and digested in 450 U/mL collagenase I, 125 U/mL collagenase XI, 60 U/mL DNase I, and 60 U/mL hyaluronidase (Sigma Aldrich) for 1 hour at 37°C. After Ficoll

separation, infiltrating cells were stained with CD45.1-PerCPCy5.5, CD34-APC, and CXCR4-PE and analyzed with an Aria fluorescence-activated cell sorter (BD).

To measure the number of infiltrating EPCs, the ischemic gastrocnemius muscles were digested as described above. The number of cells positive for $\beta 2$ -microglobulin anti-human FITC (1:200; Biolegend) and DAPI was then evaluated on a LSRII Flow Cytometer (Becton Dickinson). In a third set of experiment, 10-week-old WT C57BL/6 mice underwent medullar aplasia by total body irradiation (9.5 Gy). BM cells were then isolated from femurs and tibias of green fluorescent protein (GFP) C57BL/6 mice and intravenously injected in irradiated animals. After 8 weeks, mice underwent surgical ligation of the proximal part of the right femoral artery as described above. The gastrocnemius muscles were then harvested 2 days after ischemia. Infiltrating circulating BM-derived GFP-positive cells were detected by fluorescent microscopy; their endothelial cell phenotype was revealed by costaining with rhodamine Griffonia simplicifolia agglutinin isolectin B4 (1:100; Sigma) and their inflammatory phenotype by costaining with rat anti-mouse Mac-3 (1:300; BD Pharmingen) and donkey anti-rat RITC (1:200; Jackson ImmunoResearch).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with StatView. Kruskal-Wallis ANOVA was used to compare each parameter. Bonferroni-corrected Mann-Whitney tests were then performed to identify which group differences account for the significant overall Kruskal-Wallis. Results were expressed as mean \pm SEM.

Results

We have engineered mice encoding a *Cxcl12* gene carrying mutations (Figure 1A and Figure I in the online-only Data Supplement) that drastically reduce CXCL12/HS interactions as deduced from biochemical and biophysical measurements and functional assays in vitro and in vivo.^{11–15} K24S and K25S point mutations were introduced in the critical HS-binding domain (encoded in the second exon) shared by the 3 CXCL12 isoforms (Figure IIA in the online-only Data Supplement). Furthermore, a nonsense amber mutation was introduced in the fourth exon to prevent the translation of the distinctive 30 last Aa of the highly cationic C-ter domain of CXCL12 γ (Figure IA in the online-only Data Supplement). We opted for this strategy to avoid unpredictable consequences in the expression of a heavily CXCL12 γ -mutated protein carrying multiple substitutions in the overlapping C-ter BBXB motifs required for abrogating HS binding of this isoform.

The relative amounts of each mRNA isoform in *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} were comparable to those of WT littermates (Figure 1C and Figure IC in the online-only Data Supplement), whereas serum CXCL12 levels were markedly increased in mutant animals, likely as a consequence of the mutant chemokines to immobilize on HS structures (Figure 1D). Expression and functional analyses of *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} cDNA isoforms confirmed their preserved CXCR4 agonist capacities (Figure IIID in the online-only Data Supplement). *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice were both viable and fertile. Extensive macroscopic and histological analyses did not reveal any detectable anatomic abnormalities in the *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice. Microphotos corresponding to tissue preparations of WT and *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} BM, cerebellum, the development of which is affected in *Cxcl12* and *Cxcr4* knockout animals, and skeletal muscle are shown in Figure 1B.

No significant differences in the composition of blood, BM, and CD34⁺ hematopoietic progenitor cells were observed between WT and mutant animals (data not shown). Interestingly, whereas the number of BM hematopoietic cell subpopulations was similar in WT and *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice, mutant animals displayed higher numbers of circulating total leukocytes, granulocytes, and CD34⁺ cells (Figure 1E) and no significant differences for both T and B lymphocytes. The numbers of erythrocytes (10.72 ± 0.33 versus 10.32 ± 0.31 per 1 mm³; n=6) and platelets (944 ± 132 versus 1029 ± 197 per 1 mm³; n=6) in WT and *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice, respectively, were similar.

CXCL12 regulates both the tissue homing and survival of circulating tissue-specific progenitors, hematopoietic progenitor cells, and BM-stromal stem cells^{32,35}; triggers inflammatory cell infiltration; and is required for the periendothelial retention of circulating, BM-derived myeloid cells.^{32,35,36} These findings prompted us to assess the role of CXCL12/GAG interactions in the regenerative process after acute regional ischemia.

We observed that in both WT and *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice, hind-limb ischemia induced massive transcription and expression of *Cxcl12* isoforms (Figure 2A). Kinetic analysis of mRNA levels showed that *Cxcl12* isoform expression was enhanced as early as day 4 after ischemia and returned to basal levels by day 21 (Figure 2A). The expression ratio between the *Cxcl12* isoforms varies between different tissues (Figure IID in the online-only Data Supplement). Of interest, CXCL12 γ was the most abundant isoform in skeletal muscle (Figure 2B). We also determined that CXCL12 was expressed in ischemic capillary structure and is colocalized with isolectin B4 staining, a specific marker of endothelial cells, in both WT and *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice (Figure 2C). In addition, CXCL12 expression was detected in a number of arterioles, as revealed by the costaining between CXCL12 and α -smooth muscle actin (Figure 2D).

It is of note that *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice displayed a markedly impaired capacity to support efficient postischemic revascularization in a model of hind-limb ischemia. Indeed, laser Doppler imaging showed a reduced paw perfusion in ischemic hind limb of *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} compared with WT animals as early as day 14 after the onset of ischemia (Figure 3A). Angiographic scores obtained by microangiographic analysis revealed that vessel density was hampered by 30% in ischemic muscle of *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice compared with that of WT animals (Figure 3B). Furthermore, analysis of postischemic frozen calf muscle samples showed that regeneration of both capillary and arteriole vessels was reduced in *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} animals by up to 44% and 55%, respectively, compared with WT animals (Figure 3C and 3D).

As mentioned, CXCL12/CXCR4 interactions are involved in the recruitment and/or retention of circulating cells in the ischemic tissue. To gain further insights into the cellular and molecular mechanisms associated with the reduction of post-ischemic vessel growth in *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice, we analyzed the ability of circulating cells to home to ischemic tissues in *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} animals. CD45.1-positive cells were intravenously injected 1 day after the onset of ischemia, and their number and fate were analyzed in the blood and

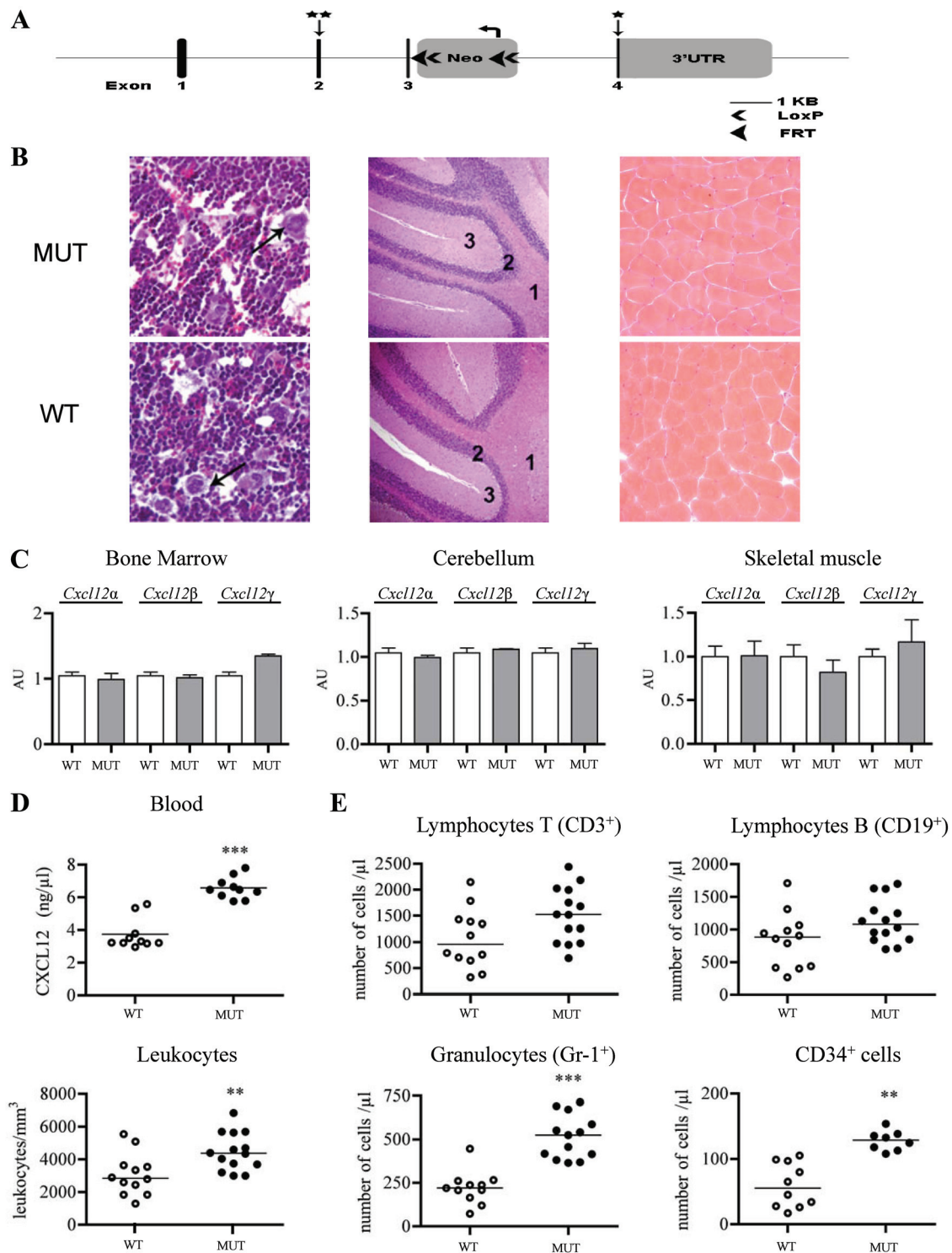


Figure 1. Characterization of *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* mice. **A**, Schematic representation of *Cxcl12* genomic locus, targeting vector, and recombined *Cxcl12* locus (*Cxcl12^{Gagtm}*). Exons 1 through 4 are represented by dark boxes. Mutations incorporating residue substitutions (second exon) and a stop codon (fourth exon) are indicated by vertical arrows and stars. The LoxP-FRT-Neo cassette is inserted in an opposite orientation from the target gene in intron 3 to 4. Long and short homology arm positions and length are indicated. UTR indicates untranslated region. **B**, Hematoxylin and eosin staining of bone marrow (left), cerebellum (middle), and skeletal muscle (right) tissue sections from *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* (MUT) and wild-type littermate (WT) animals. Arrows show megakaryocytes; 1 indicates white substance; 2, granular layer; and 3, molecular layer. **C**, Real-time polymerase chain reaction analysis of *Cxcl12*. Relative RNA expression levels of *Cxcl12* isoforms normalized to HPRT in cerebellum, bone marrow, and skeletal muscle tissues. *Cxcl12α*, *Cxcl12β*, and *Cxcl12γ* ARN levels in MUT animals are expressed relative to the level in WT animals, arbitrarily set to 1 ($n=12$ per group). **D**, Blood CXCL12 levels were measured by ELISA in MUT and WT animals. **E**, Cell populations in peripheral blood collected from MUT and WT animals. Results are mean \pm SEM. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs WT.

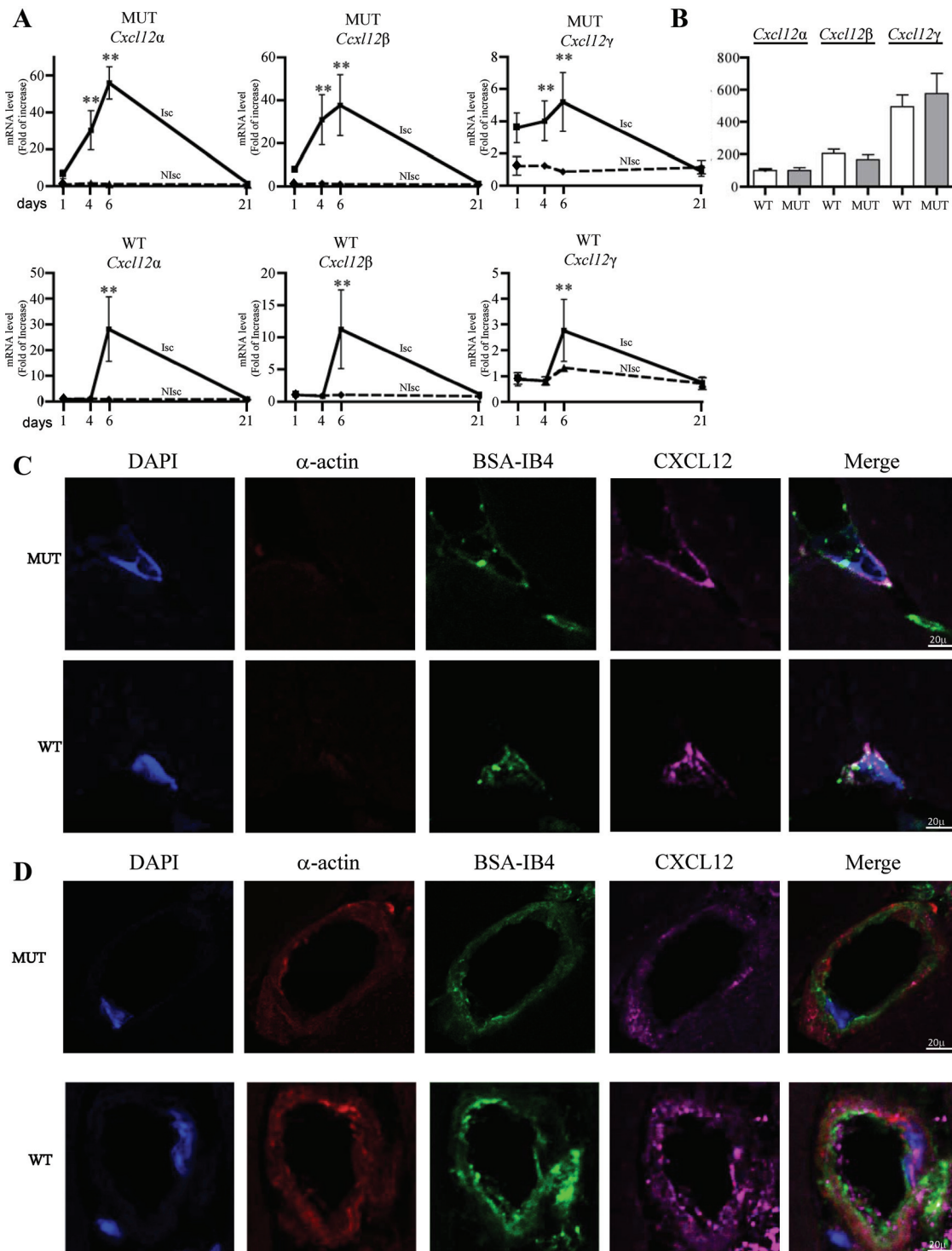


Figure 2. Expression of CXCL12 isoforms in ischemic tissue. **A**, Quantitative evaluation and relative levels of CXCL12 α , CXCL12 β , and CXCL12 γ mRNA contents 1, 4, 6, and 21 days after ischemia in ischemic and nonischemic legs of *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* (MUT) and wild-type littermate (WT) animals. Values are mean \pm SEM (n=10 per group, representative of 2 independent experiments). Twenty-eight possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P < 0.0018$ was considered significant. ** $P < 0.0003$ vs nonischemic at day 1. **B**, mRNA levels of each *Cxcl12* isoform were normalized to that of *Cxcl12α* in skeletal muscle of nonischemic tissue. Six possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P < 0.008$ was considered significant (n=10 per group). **C** and **D**, Histological sections from ischemic skeletal muscles of WT and MUT animals showing CXCL12 expression in capillary (c) and arteriolar (d) structures. Red staining indicates α -smooth muscle actin (α -smooth muscle cells); green staining, Griffonia simplicifolia agglutinin isolectin B4 (endothelial cells); purple staining, CXCL12. Nuclei were stained with DAPI (blue staining). Bars=20 μ m. One representative of 6 experiments is shown.

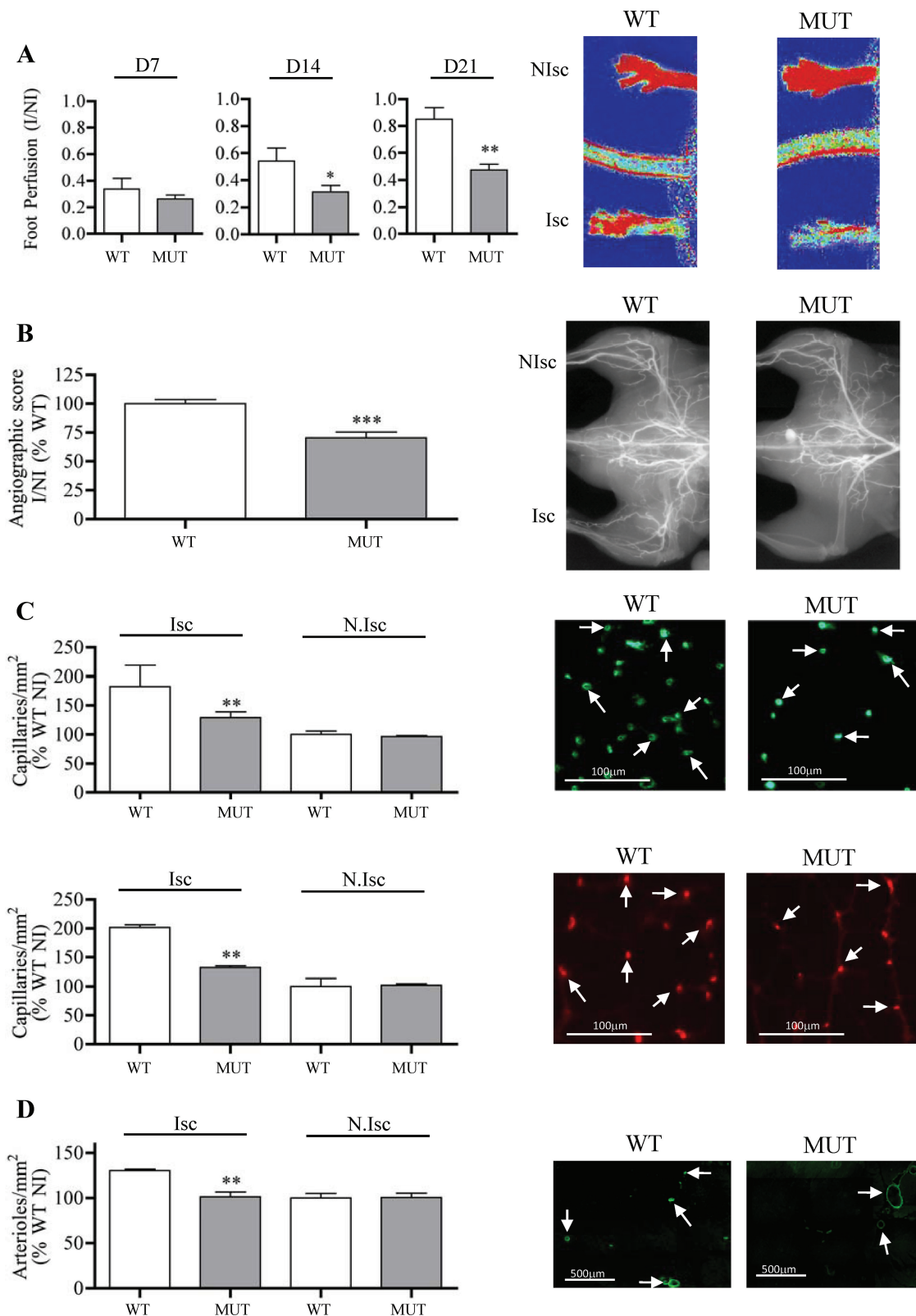


Figure 3. Postischemic revascularization in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals. Quantitative evaluation and representative photomicrographs of foot perfusion at different time points (**A**) and at day 21 for angiographic score (**B**; vessels in white), capillary density (**C**; capillaries in green, upper panel: arrows show fibronectin-labeled capillaries and lower panel: arrows show CD31-labeled capillaries), and arteriole density (**D**; arterioles in green, arrows show α -actin-labeled arterioles) in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* (MUT) and wild-type littermate (WT) animals. Results are shown in ischemic (Isc) and nonischemic (N.Isc) legs. Values are mean \pm SEM ($n=15$ per group, representative of 3 independent experiments). D indicates day. **A**, Fifteen possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P<0.003$ was considered significant. * $P<0.03$, ** $P<0.0006$ vs WT. **B**, One possible comparison for Bonferroni correction; a value of $P<0.05$ was considered significant. *** $P<0.001$ vs WT ($n=15$ per group). **C** and **D**, Six possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P<0.008$ was considered significant. ** $P<0.0016$ vs ischemic WT ($n=15$ per group).

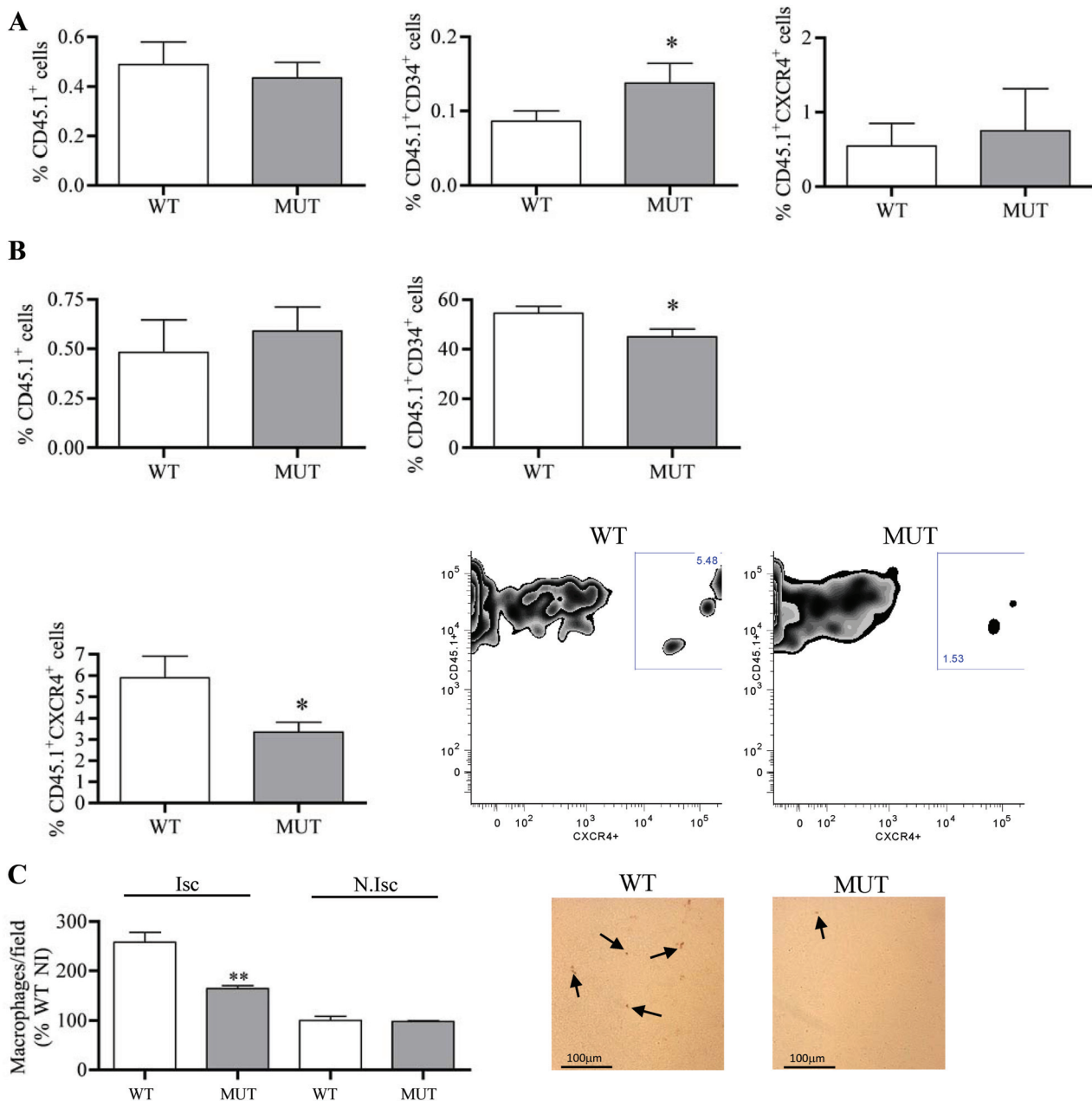


Figure 4. Quantification of infiltrating circulating cells in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals. Percentage of CD45.1⁺, CD45.1⁺/CD34⁺, and CD45.1⁺/CXCR4⁺ in blood (**A**) and ischemic muscle (**B**) 6 days after the onset of ischemia. Representative fluorescence-activated cell sorter dot plots obtained from wild-type littermate (WT) and *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* (MUT) digested muscle at 6 days after ischemia. Cells were gated on CXCR4 expressing CD45.1-positive cells. n=7 per group. **A** and **B**, One possible comparison for Bonferroni correction; a value of $P < 0.05$ was considered significant. * $P < 0.05$ vs WT. **C**, Quantitative evaluation and representative photomicrographs of Mac3-positive cells (macrophages in brown; arrows show Mac-3 labeled macrophages) in MUT and WT animals. Results are shown in ischemic (Isc) and nonischemic (N.Isc) legs. Values are mean \pm SEM (n=15 per group, representative of 3 independent experiments). Six possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P < 0.008$ was considered significant. ** $P < 0.0016$ vs ischemic WT.

ischemic tissue 6 days after ischemia, a time point associated with a marked upregulation of transcription and expression of *Cxcl12* isoforms. The number of CD45.1⁺/CD34⁺ was higher in the blood of *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals compared with WT mice. In contrast, the percentage of CD45.1⁺/CD34⁺ and CD45.1⁺/CXCR4⁺ was decreased in the ischemic muscle of *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals compared with WT mice (Figure 4A and 4B). As a consequence, the postischemic inflammatory response, a key component of ischemic tissue remodeling, is affected in our experimental conditions,

and we showed that the number of Mac3-positive cells was reduced in the ischemic legs of *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* mice compared with WT littermates (Figure 4C).

The predominant expression of CXCL12 γ in muscle, particularly its massive accumulation in ischemic tissues, suggests that this isoform might play a critical role in neovascularization through an HS-binding-dependent mechanism. Thus, if the angiogenic defect observed in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* was due to the selective invalidation of HS-binding capacity of *Cxcl12* products, exogenous admin-

istration of WT CXCL12 proteins with full HS-binding activity should restore vascular regeneration in ischemic tissues with the highest efficiency.

To assess this hypothesis, we first compared the capacity of both WT CXCL12 α and CXCL12 γ , which differ notably in their affinity capacity to bind cell surface in a GAG-dependent manner, to induce postischemic vascular regeneration in control animals. Electrotransferred expression of DNA plasmids encoding for CXCL12 α or CXCL12 γ (Figure 5A) revealed a dramatically increased potency of CXCL12 γ to promote neovascularization as evaluated by tissue perfusion, angiographic score, capillary density, and attraction of inflammatory macrophages in the ischemic tissue (Figure 5B–5E). To obtain direct and formal evidence that the superior efficiency of CXCL12 γ was actually related to the interaction of the chemokine with HS, we evaluated the proangiogenic capacities of CXCL12 γ and mutant CXCL12 γ m2, which carries the K24S and K27S substitutions combined with the neutralization of 9 of the 17 positively charged residues encompassed in the C-ter domain of this isoform^{12,13} (Figure IIIA in the online-only Data Supplement). CXCL12 γ m2 displays no detectable HS binding to cell surface HS, whereas it activates CXCR4 with preserved efficiency and even increased potency compared with the WT control (Figure IIIB and IIIC in the online-only Data Supplement) and as we reported previously.¹³ Our findings unambiguously proved that although CXCL12 α and CXCL12 γ showed proangiogenic efficiency correlating with their affinities for HS, CXCL12 γ m2 failed to induce postischemic vessel growth beyond baseline levels (Figure 5B, 5C, and 5E).

To further investigate the mechanism of the increased proangiogenic effect of CXCL12 γ , we compared the capacity of each isoform to regulate both the number of cells infiltrating the ischemic tissue and their fate. To this aim, hind-limb ischemia was induced in mice that had been lethally irradiated and reconstituted with BM-derived cells isolated from GFP⁺ mice. Electrotransfer of CXCL12 γ plasmid enhanced by 300% and 150% the number of GFP⁺ cells infiltrating the ischemic muscle compared with mice treated with empty plasmid or CXCL12 α , respectively (Figure 6A). The failure of CXCL12 γ m2 to induce a significant effect further proved the involvement of an HS-dependent mechanism in the robust neovascularization induced by CXCL12 γ . Of note, the percentages of GFP⁺/BS1-lectin⁺ cells of the endothelial lineage and GFP⁺/Mac3⁺ revealing the macrophage phenotype were similar in mice treated with CXCL12 γ or CXCL12 α . Further experiments using human EPCs labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester revealed that CXCL12 γ , but not CXCL12 γ m2, increased the number of EPCs infiltrating ischemic hind-limb muscle (day 4 after ischemia) by 150% and subsequently vessel growth by \approx 50% (day 14 after ischemia) compared with mice treated with CXCL12 α (Figure IV in the online-only Data Supplement).

Collectively, these results suggest that CXCL12 γ regulates the accumulation of BM-derived cells in ischemic tissues with the highest efficiency compared with CXCL12 α and in a strictly HS-dependent manner, although it does not differ from CXCL12 α in terms of induction of cell differentiation. The increased number of EPCs homing to the injured muscle early after ischemia allows it to ascribe its prominent proan-

giogenic effect to a primary attraction of endothelial cell precursors.

Finally, to demonstrate that the deficient neoangiogenesis observed in *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} animals was related to the expression of CXCL12 HS-binding mutants and their inability to promote efficient vascular repair, we electrotransferred a plasmid encoding WT CXCL12 γ plasmid in the ischemic hind limb. Expression of this isoform virtually normalized vascular regeneration in ischemic tissues, as proved by the significant increase in both vessel density and infiltration of inflammatory macrophages (Figure 7). This finding conclusively links the default of tissue repair observed in these animals to the reduced capacity of mutant CXCL12 proteins to form complexes with HS proteoglycans.

Discussion

The animal model we have engineered allows the selective characterization of proteoglycan-chemokine interactions in vivo separately from interactions of a defined chemokine to its specific receptor. *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice exhibit normal expression of isoform-specific *Cxcl12* mRNAs encoding for CXCR4 agonist chemokines. No detectable developmental anomalies were observed in *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} animals. This is in sharp contrast to *Cxcl12*- and *Cxcr4*-deficient mice, which show abnormal hematopoiesis and multiple organogenesis default associated with perinatal mortality,^{20,21,37} and *Cxcr7* knockout mice, which show disrupted cardiac development.³⁸ Manifold reasons could explain the lack of detectable anatomic anomalies in the mutant animals: the preserved expression levels of total and isoform-specific *Cxcl12* mRNA in *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice tissues; the intact cell signaling capacities of mutant chemokines, leading to orientated cell migration, as previously shown for mutated CCL19 and CCL21¹; and the fact that the high-affinity oligosaccharidic HS structure recognized by CXCL12, which remains unknown, could not be displayed on HS during embryogenesis and appears later during adult life, thus explaining the apparent lack of developmental effects. Thus, a binding-specificity switch of brain HS proteoglycans from fibroblast growth factor-2 to -1 has been proved,³⁹ demonstrating that indeed the binding capacity of embryonic HS for a given protein is not necessarily present and is acquired during development.

The *Cxcl12*^{Gagtm/Gagtm} mice nevertheless display a subtle anomaly revealing an increased number of circulating white blood cells, including CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. This phenomenon could be explained by a reduced attraction/retention in lymphoid tissues and is probably related to impaired HS-dependent tissue adhesiveness of the CXCL12 mutant proteins.^{5,15} Given the crucial role played by CXCL12 and CXCR4 in both the homing of hematopoietic cells to the BM^{25,26}, the inability of the HS-binding CXCL12 mutants to adhere to the cell surface and the surrounding extracellular matrix of CXCL12-producing stromal cells forming CXCL12-BM niches,⁴⁰ could facilitate their egress from the BM. In this regard, the accumulation of circulating CD34⁺ cells, which normally reside in BM,⁴¹ strongly argues in favor of reduced retention of these cells in BM. The BM egress of the mature leukocytes could also be due to the same mecha-

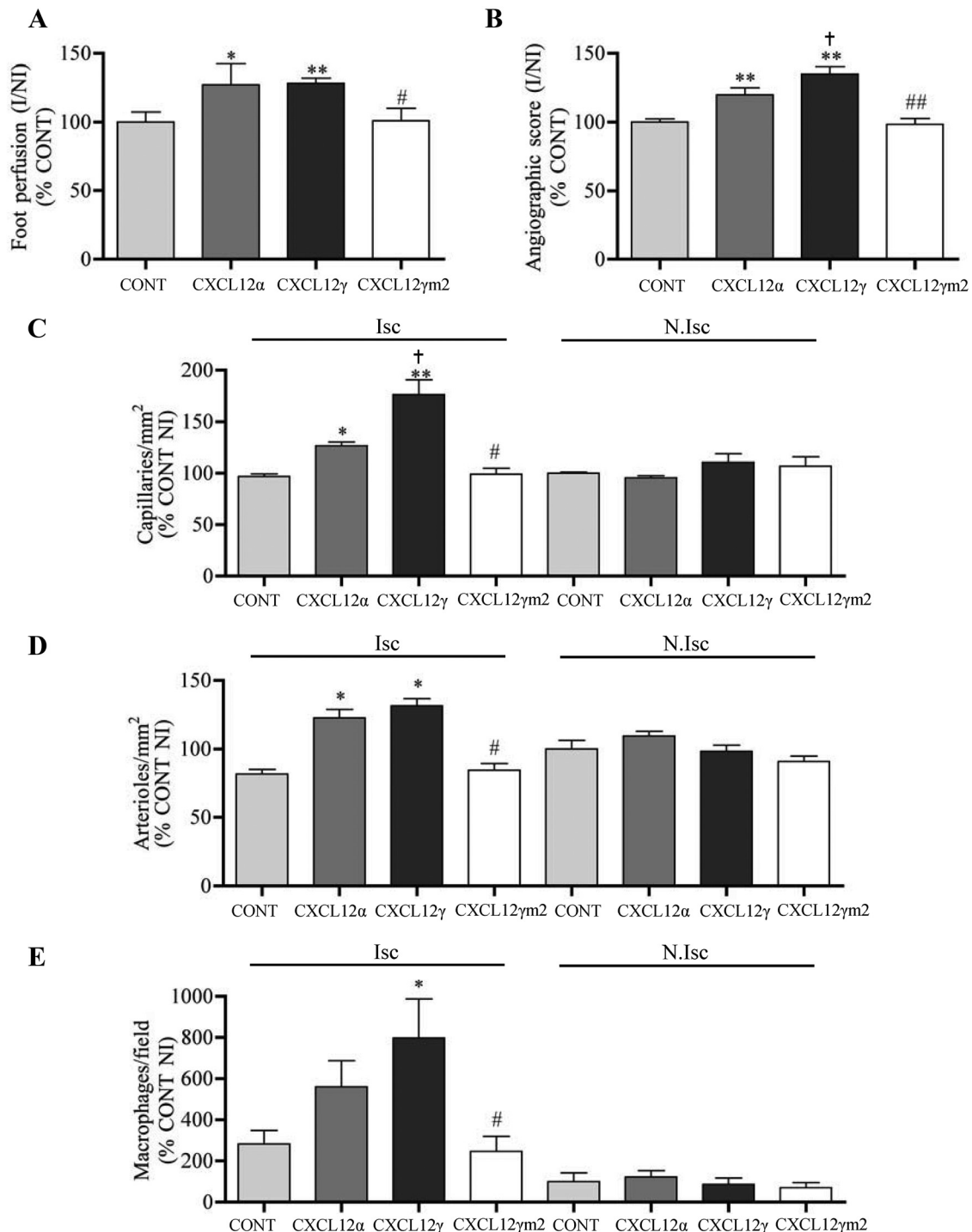


Figure 5. Effect of CXCL12 isoforms on postischemic revascularization. Quantitative evaluation of foot perfusion (**A**), microangiography (**B**), capillary density (**C**), arteriolar density (**D**), and macrophage infiltration (**E**) 21 days after ischemia in C57BL/6 mice transfected with empty DNA plasmid (CONT) or DNA expression vectors encoding CXCL12α, CXCL12γ, or CXCL12γm2. Values are mean±SEM (n=15 per group, representative of 3 independent experiments). **A** and **B**, Six possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P<0.008$ was considered significant. * $P<0.008$, ** $P<0.0016$ vs PBS; † $P<0.008$ vs CXCL12α; # $P<0.008$, ## $P<0.0016$ vs CXCL12γ. **C** through **E**, Twenty-eight possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P<0.0017$ was considered significant. * $P<0.0017$ vs ischemic CONT; † $P<0.0017$ vs ischemic CXCL12α; # $P<0.0017$ vs ischemic CXCL12γ. Isc indicates ischemic leg; N.Isc, nonischemic leg; I/Nl, ischemic/nonischemic.

nism. Alternatively, the increased number of these cells in the periphery could be ascribed to the gradient generated by the blood accumulation of free, HS-binding, disabled CXCL12 proteins and/or their failure to firmly immobilize on the

apical surface of sinus and postcapillary endothelial cells,^{13,15} which would inhibit the return of leukocytes to the BM.⁴²

Whereas basal coronary flow was impaired in *Cxcr4*^{+/-} mice, paralleled by reduced angiogenesis and myocardial vessel den-

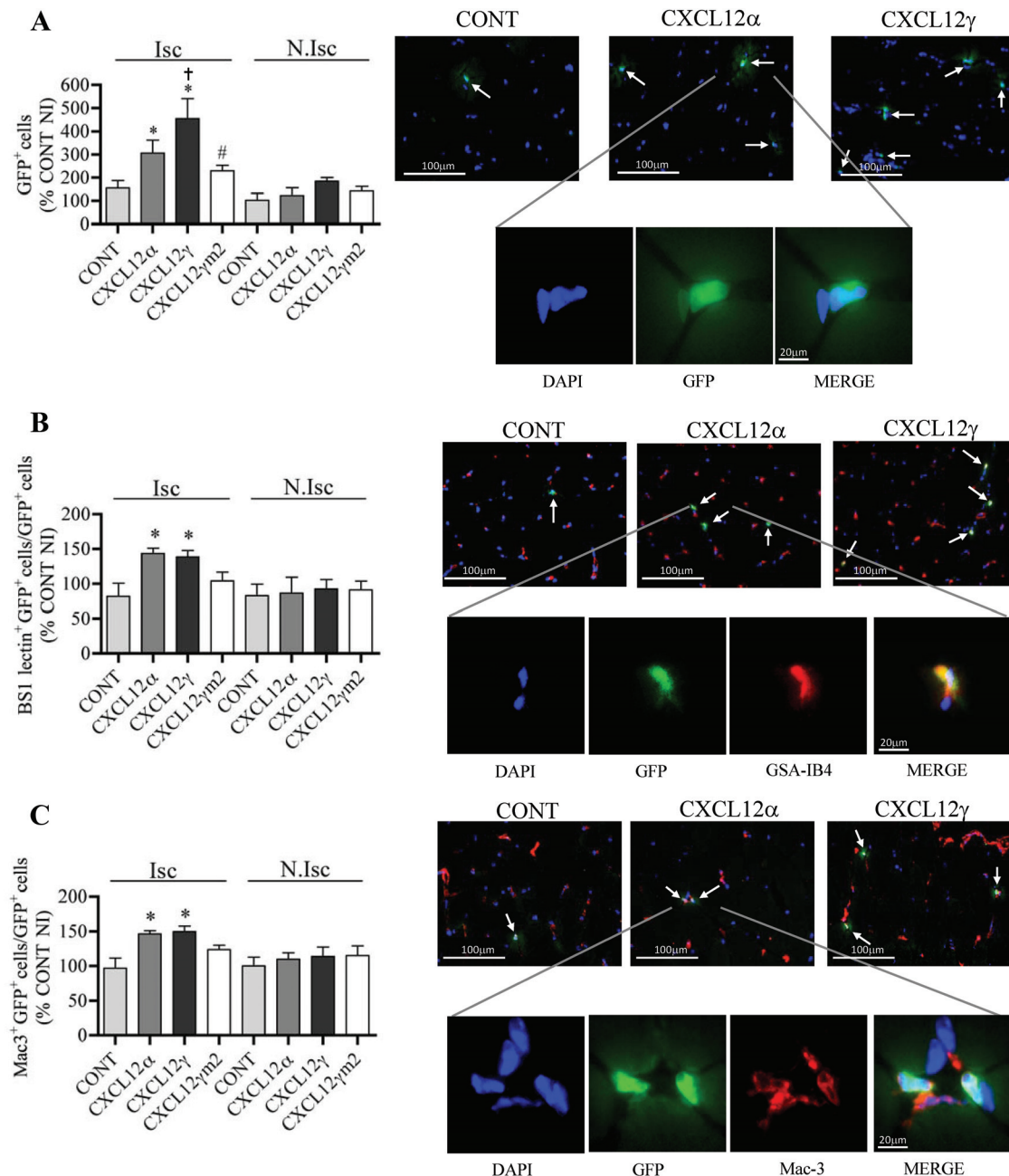


Figure 6. CXCL12 γ controls bone marrow–derived cells infiltration in ischemic tissues. Quantitative evaluation and representative photomicrographs of the percentage of green fluorescent protein (GFP)–expressing cells (**A**), GFP–expressing and BS1-labeled cells (**B**), and GFP–expressing and Mac3–labeled cells (**C**) in the ischemic leg (Isc) of irradiated wild-type (WT) mice reconstituted with bone marrow of WT GFP⁺ animals and treated with empty DNA plasmid (CONT) or DNA expression vectors encoding for CXCL12 α , CXCL12 γ , or the heparan sulfate–binding mutant CXCL12 γ m2. Value quantification is represented in histograms. Values are mean \pm SEM (n=10 per group, representative of 2 independent experiments). **A** through **C**, Twenty-eight possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P<0.0017$ was considered significant. * $P<0.0017$ vs ischemic CONT; † $P<0.0017$ vs ischemic CXCL12 α ; # $P<0.0017$ vs ischemic CXCL12 γ . N.Isc indicates nonischemic leg.

sity, we did not detect changes in the basal number of capillary and arterioles in skeletal muscle of *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals.⁴³ In contrast, *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals show a marked default in angiogenesis and neovascularization of ischemic tissues, revealing a biological role for CXCL12/GAG interactions in tissue repair after ischemia. It has previously been reported that recruitment of CXCR4–positive progenitor cells to regenerating tissues is mediated by hypoxic gradients via hypoxia-inducible factor-1–induced expression of CXCL12.³² Fur-

thermore, CXCL12 attracts EPCs, induces angiogenesis, and increases the number of newly formed vessels and blood flow in models of hind-limb ischemia when overexpressed either alone⁴⁴ or in combination with cell therapy.⁴⁵ Recruitment and retention of BM–derived circulating inflammatory cells mediated by CXCL12 participate in vascular remodeling and arteriole growth.³⁶ In addition, CXCL12 seems to have a direct effect on the migration of smooth muscle cells and smooth muscle progenitor cells.⁴⁶

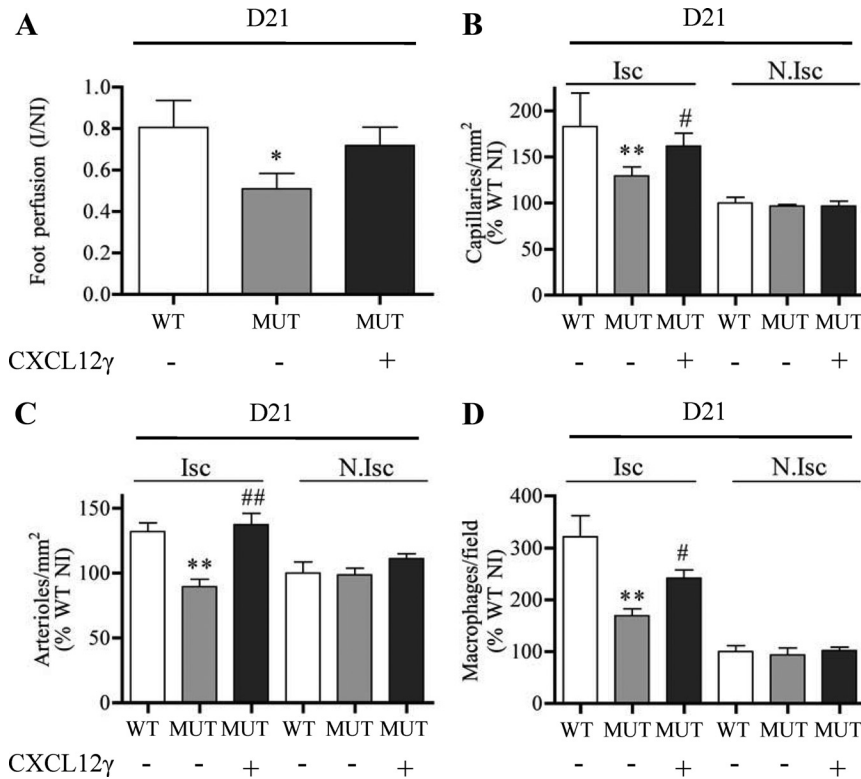


Figure 7. CXCL12 γ restores the defective angiogenic phenotype in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals. Quantitative evaluation of foot perfusion (**A**), capillary density (**B**), arteriole density (**C**), and Mac3-positive cells (**D**) in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* (MUT) and wild-type littermate (WT) animals treated with or without DNA expression vector encoding CXCL12 γ . Results are shown in ischemic (Isc) and nonischemic (N.Isc) legs. Values are mean \pm SEM (n=10 per group). **A**, Three possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P<0.016$ was considered significant. * $P<0.016$ vs WT. **B** through **D**, Fifteen possible comparisons for Bonferroni correction; a value of $P<0.003$ was considered significant. ** $P<0.0006$ vs ischemic WT; # $P<0.003$, ## $P<0.0006$ vs ischemic MUT.

However, all previous studies focused on deciphering the capacity of CXCL12 α to promote angiogenesis without dissecting the respective contribution of receptor activation and GAG binding. Furthermore, only the therapeutic capacity of exogenous WT chemokines was investigated, whereas the role played by endogenous CXCL12/GAG interactions in the spontaneous postischemic recovery remains unknown.

The defective postischemic neovascularization observed in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals thus brings new light to the original evidence that, beyond CXCL12-induced receptor cell signaling, the endogenous CXCL12/GAG interactions play a critical role in tissue regeneration, particularly vascular growth. Indeed, the efficiency of CXCL12 γ to rescue the default in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals contrasts with the lack of effect of CXCL12 γ m2 and reveals the key role of this mechanism in the reparative process. This finding is in keeping with the efficiency of CXCL12 γ and the inability of CXCL12 γ m2 to promote homing of BM-derived circulating inflammatory cells and circulating EPCs into ischemic tissues and to modulate vessel growth in this setting.

Bound to HS structures on the apical surface of endothelial cells,⁴⁷ CXCL12 expressed by autocrine or juxtacrine mechanisms could be determinant for vascular targeting of circulating progenitor and inflammatory cells and induction, in an integrin- and CXCR4-dependent manner, of both firm adhesion and transendothelial migration of infiltrating BM-derived cells.⁴⁸ Among CXCL12 isoforms, CXCL12 γ binds to microvascular endothelial cell surface with the highest efficiency^{13,47} and is ideally suited to accomplish this role. Abundantly expressed and induced in injured tissues by hypoxia, CXCL12 γ could delimit a static field of chemokine, keeping cells motile (haptokinesis) in a restrained tissue

compartment. This may contribute to the reparative effect of EPCs by enhancing cell adhesiveness and survival.⁴⁹ It could be hypothesized that, released progressively on cleavage of its C-ter domain, the pool of immobilized CXCL12 γ could provide a gradient of active, diffusible chemokines that would promote long-range chemotaxis toward the injured tissue. An analogous mechanism contributes to the regulation by CCL21 of lymphocyte T-cell homing in secondary lymphoid organs.¹

In terms of the potential of CXCL12 in regenerative medicine, the continuous delivery or administration in an immobilized form of CXCL12 α is required to provide therapeutic effect in postischemic treatment.⁵⁰ CXCL12 γ could overcome this limitation, thus efficiently activating the proangiogenic mechanisms.

Collectively, our findings unravel the contribution of endogenous CXCL12/HS complexes to the biological functions of this chemokine. The prevalence of CXCL12 γ expression in hypoxic conditions and its superior capacity to promote neovascularization further highlight the importance of HS-binding mechanisms in the tissue reparative activity of CXCL12.

These findings pave the way for investigating the contribution of CXCL12/HS interactions to other homeostatic and physiopathological functions played by this unique chemokine and could eventually have broad relevance for other chemokine systems.

Sources of Funding

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR; Chemoglycan, NT05-4 41967; Chemrepair 2010-BLAN112702), INSERM, Institut Pasteur PTR-395, and Mizutani Foundation (Japan) and by institutional funding from INSERM. Dr Silvestre is a recipient of a Contrat d'Interface from Assistance

Publique-Hôpitaux de Paris and is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale. Drs Rueda and Gasse are recipients of ANR fellowships. Dr Récalde has received fellowships from Fondation pour la Recherche Médicale and from Région Ile de France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Disclosures

None.

References

- Schumann K, Lammermann T, Bruckner M, Legler DF, Polleux J, Spatz JP, Schuler G, Forster R, Lutz MB, Sorokin L, Sixt M. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity*. 2010;32:703–713.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*. 1998;279:381–384.
- Lortat-Jacob H. The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19:543–548.
- Lortat-Jacob H, Grosdidier A, Imberty A. Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1229–1234.
- Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood*. 2002;99:44–51.
- Bao X, Moseman EA, Saito H, Petryniak B, Thiriot A, Hatakeyama S, Ito Y, Kawashima H, Yamaguchi Y, Lowe JB, von Andrian UH, Fukuda M. Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes. *Immunity*. 2010;33:817–829.
- Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1885–1890.
- Laguri C, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H. Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines—the CXCL12 example. *Carbohydr Res*. 2008;343:2018–2023.
- Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*. 1993;261:600–603.
- Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, Muller HW. Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci*. 2000;12:1857–1866.
- Amara A, Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, Virelizier JL, Delepierre M, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem*. 1999;274:23916–23925.
- Laguri C, Sadir R, Rueda P, Baleux F, Gans P, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H. The novel CXCL12gamma isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and cxcr4. *PLoS One*. 2007;2:e1110.
- Rueda P, Balabanian K, Lagane B, Staropoli I, Chow K, Leveay A, Laguri C, Sadir R, Delaunay T, Izquierdo E, Pablos JL, Lendinez E, Caruz A, Franco D, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F. The cxcl12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One*. 2008;3:e2543.
- Sadir R, Baleux F, Grosdidier A, Imberty A, Lortat-Jacob H. Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J Biol Chem*. 2001;276:8288–8296.
- O'Boyle G, Mellor P, Kirby JA, Ali S. Anti-inflammatory therapy by intravenous delivery of non-heparan sulfate-binding CXCL12. *FASEB J*. 2009;23:3906–3916.
- Oberlin E, Amara A, Bachelierie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted hiv-1. *Nature*. 1996;382:833–835.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996;382:829–833.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelierie F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005;280:35760–35766.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*. 2006;203:2201–2213.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382:635–638.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9448–9453.
- Coulomb-L'Hermine A, Amara A, Schiff C, Durand-Gasselin I, Foussat A, Delaunay T, Chaouat G, Capron F, Ledee N, Galanaud P, Arenzana-Seisdedos F, Emilie D. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8585–8590.
- Pablos JL, Amara A, Boulou A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, Delaunay T, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*. 1999;155:1577–1586.
- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*. 1997;185:111–120.
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomarev T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3:687–694.
- Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH, Lee Y, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Shaheen M, Li X, Clapp DW. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol*. 2003;73:630–638.
- Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*. 1999;104:1199–1211.
- Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Forster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2002;196:65–75.
- Scimone ML, Felbinger TW, Mazo IB, Stein JV, Von Andrian UH, Weninger W. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med*. 2004;199:1113–1120.
- Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C987–C995.
- Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, Garcia-Lazaro FJ. Synovial cell-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2003;170:2147–2152.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10:858–864.
- Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimi TG, Lere-Dean C, Contreres JO, Sulpice E, Levy BI, Plouet J, Tobelem G, Le Ricousse-Roussanne S. PSGL-1-mediated activation of EPHB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2007;117:1527–1537.
- Silvestre JS, Thery C, Hamard G, Boddaert J, Aguilar B, Delcayre A, Houbon C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Levy B, Tedgui A, Amigorena S, Mallat Z. Lactadherin

- promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med*. 2005;11:499–506.
35. Cashman J, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells in vitro and in NOD/SCID mice. *Blood*. 2002;99:792–799.
 36. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006;124:175–189.
 37. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393:595–599.
 38. Siero F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez AC, Mackay CR, Mackay F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14759–14764.
 39. Nurcombe V, Ford MD, Wildschut JA, Bartlett PF. Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science*. 1993;260:103–106.
 40. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25:977–988.
 41. Levesque JP, Winkler IG. Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13:53–58.
 42. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19:583–593.
 43. Liehn EA, Tuchscheerer N, Kanzler I, Drechsler M, Fraemohs L, Schuh A, Koenen RR, Zander S, Soehnlein O, Hristov M, Grigorescu G, Urs AO, Leabu M, Bucur I, Merx MW, Zernecke A, Ehling J, Gremse F, Lammers T, Kiessling F, Bernhagen J, Schober A, Weber C. Double-edged role of the CXCL12/CXCR4 axis in experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:2415–2423.
 44. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 α enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2004;109:2454–2461.
 45. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107:1322–1328.
 46. Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. SDF-1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005;96:784–791.
 47. Santiago B, Izquierdo E, Rueda P, Del Rey MJ, Criado G, Usategui A, Arenzana-Seisdedos F, Pablos JL. CXCL12 γ isoform is expressed on endothelial and dendritic cells in rheumatoid arthritis synovium and regulates T cell activation. *Arthritis Rheum*. 2012;64:409–417.
 48. Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, Robinson MK, Staunton DE, von Andrian UH, Alon R. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol*. 2005;6:497–506.
 49. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:604–617.
 50. Segers VF, Revin V, Wu W, Qiu H, Yan Z, Lee RT, Sandrasagra A. Protease-resistant stromal cell-derived factor-1 for the treatment of experimental peripheral artery disease. *Circulation*. 2011;123:1306–1315.

CLINICAL PERSPECTIVE

CXCL12 regulates with unchallenged capacity both the tissue homing and survival of circulating tissue-specific progenitors, hematopoietic cells, and bone marrow stem cells and triggers inflammatory cell infiltration. Beyond the binding to its cognate receptor CXCR4, we speculate that the interaction of CXCL12 with proteoglycans, particularly heparan sulfate, enables the formation of chemokine gradients that determine the orientated migration and tissue recruitment of circulating cells. We engineered a mouse carrying a *Cxcl12* gene (*Cxcl12^{Gagtm}*) mutation that precludes interactions with heparan sulfate structures while not affecting CXCR4-dependent cell signaling of CXCL12 isoforms. After induced acute ischemia, a marked impaired capacity to support revascularization was observed in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals associated with a reduced number of infiltrating cells in the ischemic tissue. Of interest, *Cxcl12 γ* was the most abundant isoform in both the normal and ischemic muscle. Importantly, exogenous administration of CXCL12 γ , which binds heparan sulfate with the highest affinity ever reported for a cytokine, fully restored vascular growth, whereas heparan sulfate-binding CXCL12 γ mutants failed to promote revascularization in *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals. In terms of the potential of CXCL12 in regenerative medicine, the continuous delivery or administration in an immobilized form of CXCL12 α is required to provide therapeutic effect in postischemic treatment. CXCL12 γ could overcome this limitation, thus efficiently activating the proangiogenic mechanisms. The findings presented here pave the way for investigating the contribution of CXCL12/heparan sulfate interactions to other homeostatic and physiopathological functions played by this unique chemokine and could eventually have broad relevance for other chemokine systems.

Supplemental Material

Supplemental figures legend

Supplementary Figure 1. Construction and sequencing validation of point mutation targeting vector of *Cxcl12*. (a) Point mutations in 2nd and 4th exons were generated by 3-step PCR mutagenesis using PT1-PT4 and PT5-PT8 primers. The PCR fragments carrying mutations were then used to replace the correspondent wild type sequence using conventional sub cloning methods. (b) The boundaries of the two homology arms (LA , SA) were confirmed by sequencing with P6 and T7 primers that read through both sides of the backbone vector. The floxed Neo cassette was confirmed by sequencing with N1 and N2 primers that read from the 5'- and 3'- ends of the Neo cassette, respectively, into the genomic sequences. The mutations were confirmed by sequencing with PT1, SQ1 and PT8 primers. The sequencing results also proved that no other mutations were introduced into exon 2 and exon 4 before the natural stop codon.

Primers used to generate the point mutations (mutations are in bold and underlined)

PT1 (**Acc65I**): 5'- ACTT**GGTACCAACTTTCTGTAACCATTCCTGC** -3'

PT2: 5'- **AGACAGATGC**GA**GACGTTGGCTCTGGCGATGTGGCTC** -3'

PT3: 5'- ACATCGCCAGAGCCAACGT**CT**CGCATCTGT**CT**ATCCTCAACACTCCAAACTGTG -3'

PT4 (**Acc65I**): 5'- ACTTGGTACCCTCTGAGCAAGTGAGTGCAAGTG -3'

PT5 (**Acc65I**): 5'- ACTT**GGTACCTCTCTAGAACAATCTCAGTTATCC** -3'

PT6: 5'- **CTACCTTAGATAAAATTAGTAGAACC** -3'

PT7: 5'- GTTCTACTAATTTTATCTAAGGTAGGGGCGCAGAGAAGAAAAAGTGG -3'

PT8 (**Acc65I**): 5'- ACTT**GGTACC**AGAGTTTACCGTCAGGTTTGAGC -3

Sequencing Primer Sequences

Primer N1 5' -TGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGC- 3'

Primer N2 5' -TTCCTCGTGCTTTACGGTATCG- 3'

Primer P6 5' -GAGTGCACCATATGGACATATTGTC- 3'

Primer T7 5' -TAATGCAGGTAAACCTGGCTTATCG- 3'

Primer PT1 5' -ACTT**GGTACCA**ACTTTCTGTAACCATTCCTGC- 3'

Primer SQ1 5' -ACAGGACACATCTCTGCCAAGTC- 3'

Primer PT8 5' -ACTT**GGTACC**AGAGTTTACCGTCAGGTTTGAGC- 3'

Supplementary Figure 2. Characterization of *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* animals. (A)

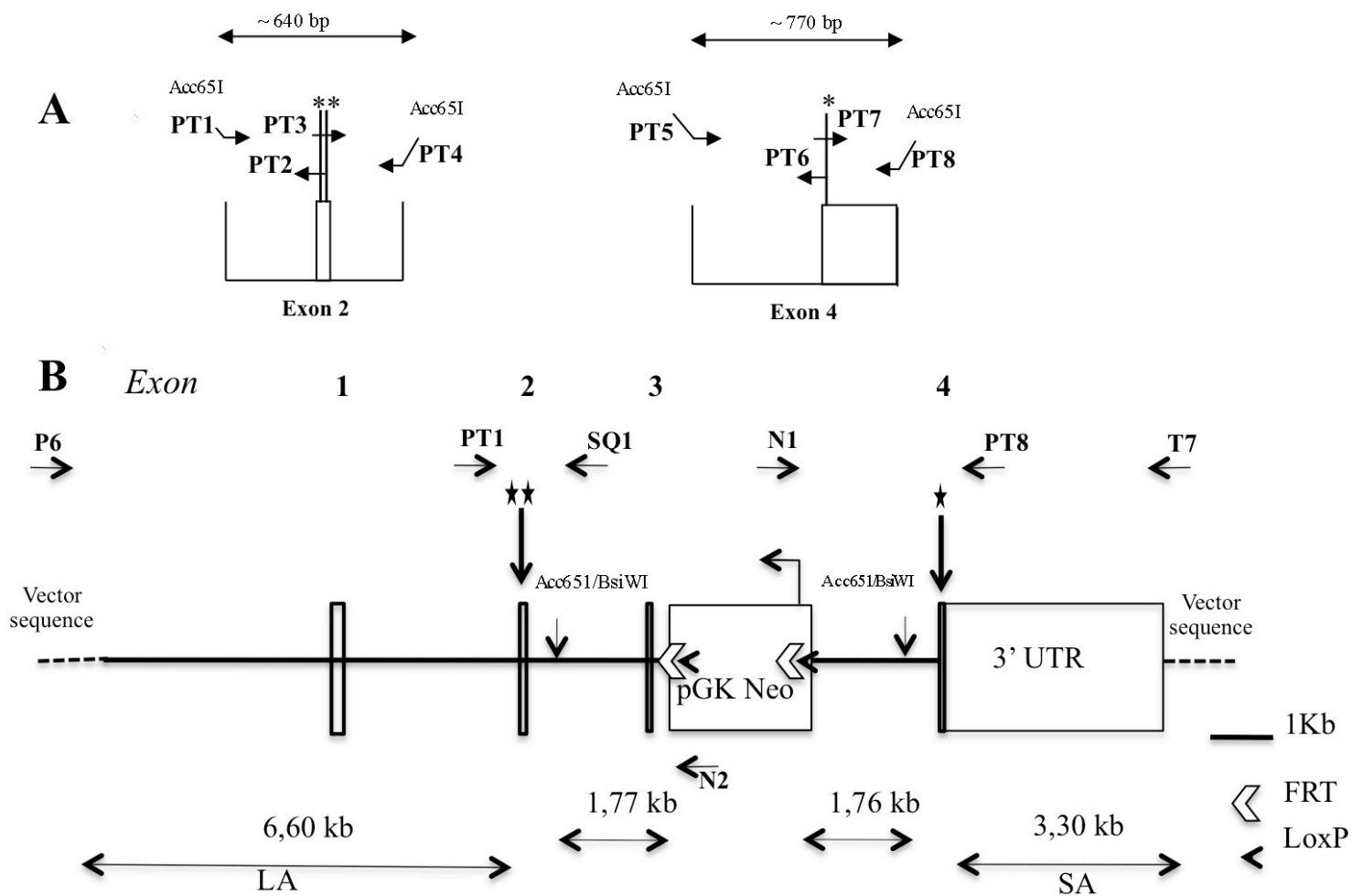
Schematic diagram of *Cxcl12* isoforms structures and sequence alignment of the corresponding mature proteins. Mutations introduced in *Cxcl12^{Gagtm}* are indicated (stars). In the amino-acid sequence the substituted residues corresponding to mutations are underlined. The incorporation of the non-sense mutation in the open reading frame of *Cxcl12 γ* generates a truncated protein of 68Aa-length identical to *Cxcl12 α* , which last aminoacid (K68) is marked by a star. (B) PCR amplification on genomic DNA from wild type (WT), *Cxcl12^{Gagtm/wt}* (Het) and *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* (Mut) animals. (C-D) Real-time PCR analysis of *Cxcl12* products. (C) RNA expression levels of each isoform normalized to HPRT in brain and thymus tissues from WT and

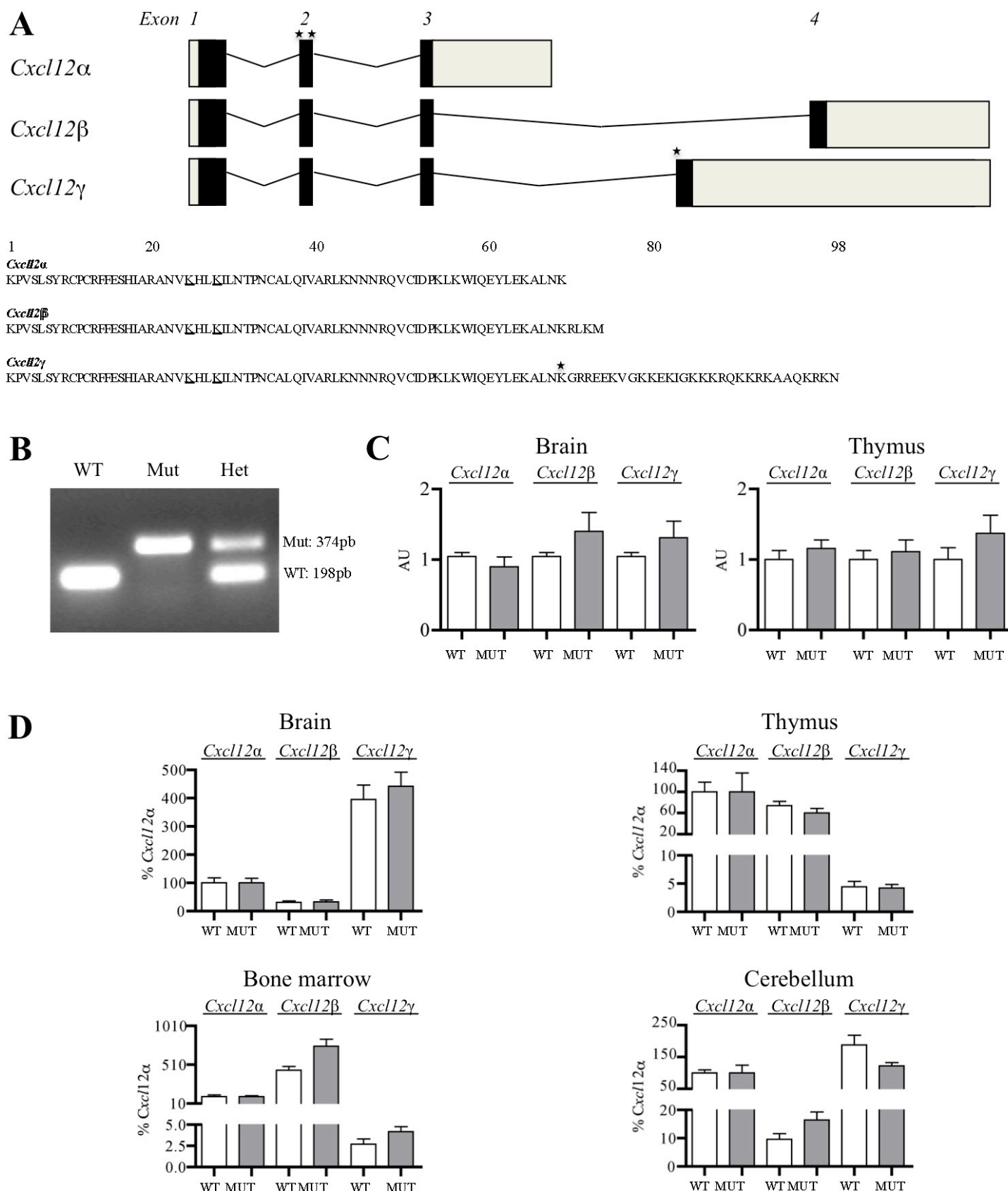
Cxcl12^{Gagtm/Gagtm} animals. (D) mRNA levels of each *Cxcl12* isoform were normalized to that of *Cxcl12a*

Supplementary Figure 3. Functional properties of WT and HS-binding mutant CXCL12 used for post-ischemic revascularization treatment or expressed from *Cxcl12^{Gagtm}* animals. (a) Sequence alignment of CXCL12 WT and mutant chemokines used in experiments described in b and c. In bold, HS-binding motifs; underlined, substituted amino acids. (b) Cell surface (CHO cells) binding activity and (c) chemotactic properties of synthetic WT and HS-binding mutants CXCL12am and CXCL12gm2 assessed in CD4⁺ T lymphocytes. (d) Quantitative evaluation of EPC migration through transwell membrane in response to treatment with supernatant of HEK293 T transfected cells with cDNA coding either for WT or mutant isoforms isolated from *Cxcl12^{Gagtm}* animals. CXCL12 content in supernatants was measured by ELISA and for each WT/mutant couple equal amounts (ranging from 0,5 to 1nM) were used. Open bars: synthetic CXCL12a, 1nM. AMD3100 (5mM) is a low molecular, synthetic CXCR4 antagonist. PBS, Phosphate buffered saline.**p<0.01 versus PBS, † p<0.05 versus conditions without AMD3100. n = 10 per group, representative of 2 independent experiments.

Supplementary Figure 4. CXCL12g controls EPC infiltration in ischemic tissues. (a) Quantitative evaluation of EPC migration through transwell membrane in response to VEGF, CXCL12 α or CXCL12g, in presence or absence of the synthetic CXCR4 antagonist, AMD3100 (5mM). n = 6 to 8 per group, representative of 2 independent experiments.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus PBS, ††† p<0.001 versus CXCL12 α , ## p<0.01 versus CXCL12 γ . (b) Number of CFSE-stained human EPC (EPC) in the ischemic leg of C57BL/6 mice treated with intramuscular administration of cDNA expression vector encoding CXCL12 α , CXCL12g or CXCL12gm2, 4 days after the onset of ischemia. Quantitative evaluation of foot perfusion (c), microangiography (d) and capillary density (e), 14 days after ischemia in C57BL/6 mice treated with intravenous administration of EPC only or along with intramuscular cDNA expression vector encoding CXCL12 α , CXCL12g or CXCL12gm2. Empty DNA plasmid (CONT). Values are mean \pm SEM. n = 10 per group, representative of 2 independent experiments. 10 possible comparisons for Bonferroni correction, a value of p<0.005 was considered significant. *p<0.005, **p<0.001, versus CONT, † p<0.005, †† p<0.001 versus CXCL12 α +EPC, ##p<0.001 versus CXCL12 γ + EPC.





A

1 20 40 60 80 98

CXCL12 α

WT KPVSLSYRCPCRFFESHARANV**KHL**KILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

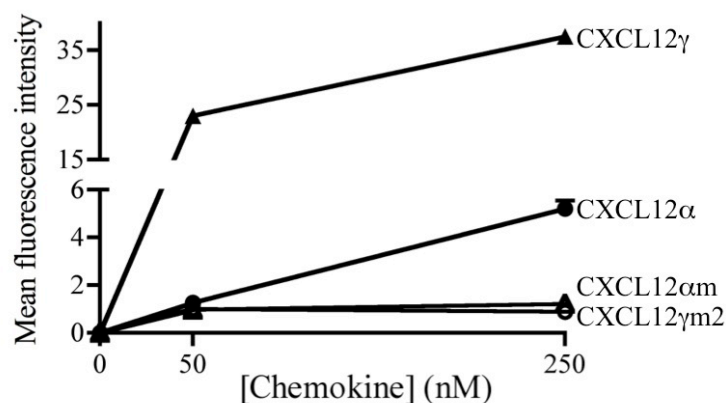
m KPVSLSYRCPCRFFESHARANV**SHLS**ILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

CXCL12 γ

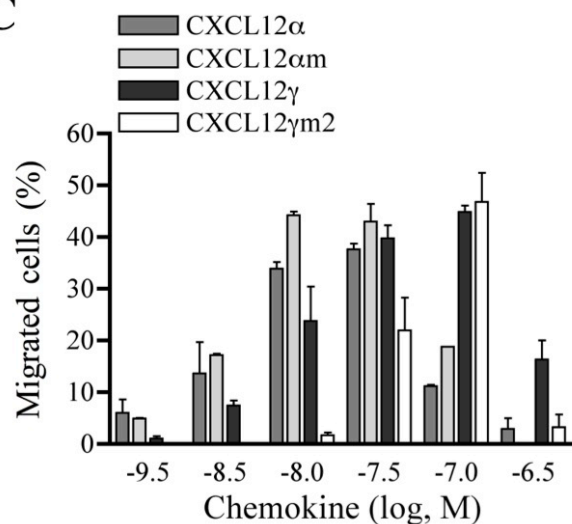
WT KPVSLSYRCPCRFFESHARANV**KHL**KILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKGRREEKV**GKKEKIGKKRQKKR**KAAQKRKN

m2 KPVSLSYRCPCRFFESHARANV**SHLS**ILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKGRREEKV**SSSE**SIG**SSK**SQ**SSR**SAAQKRKN

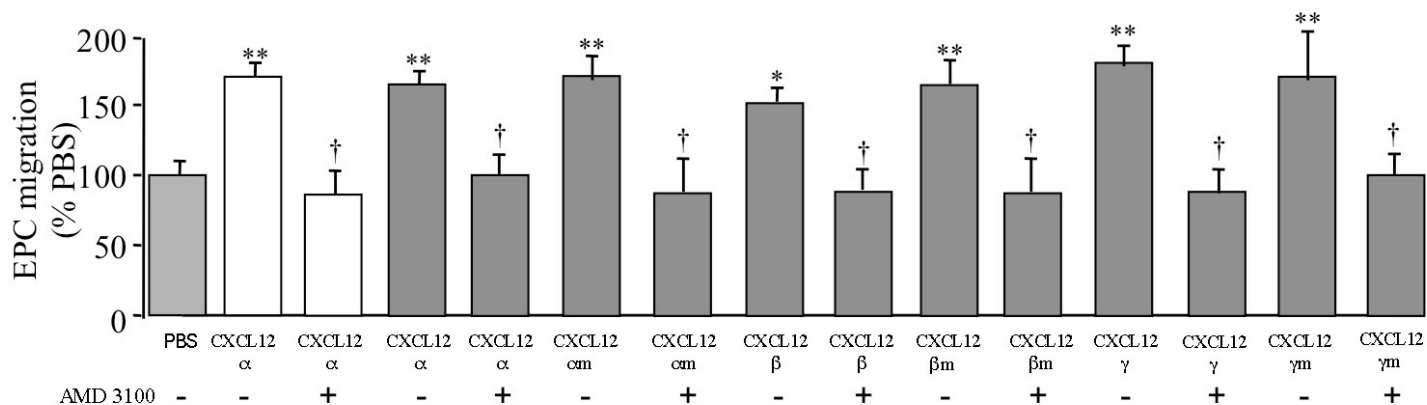
B

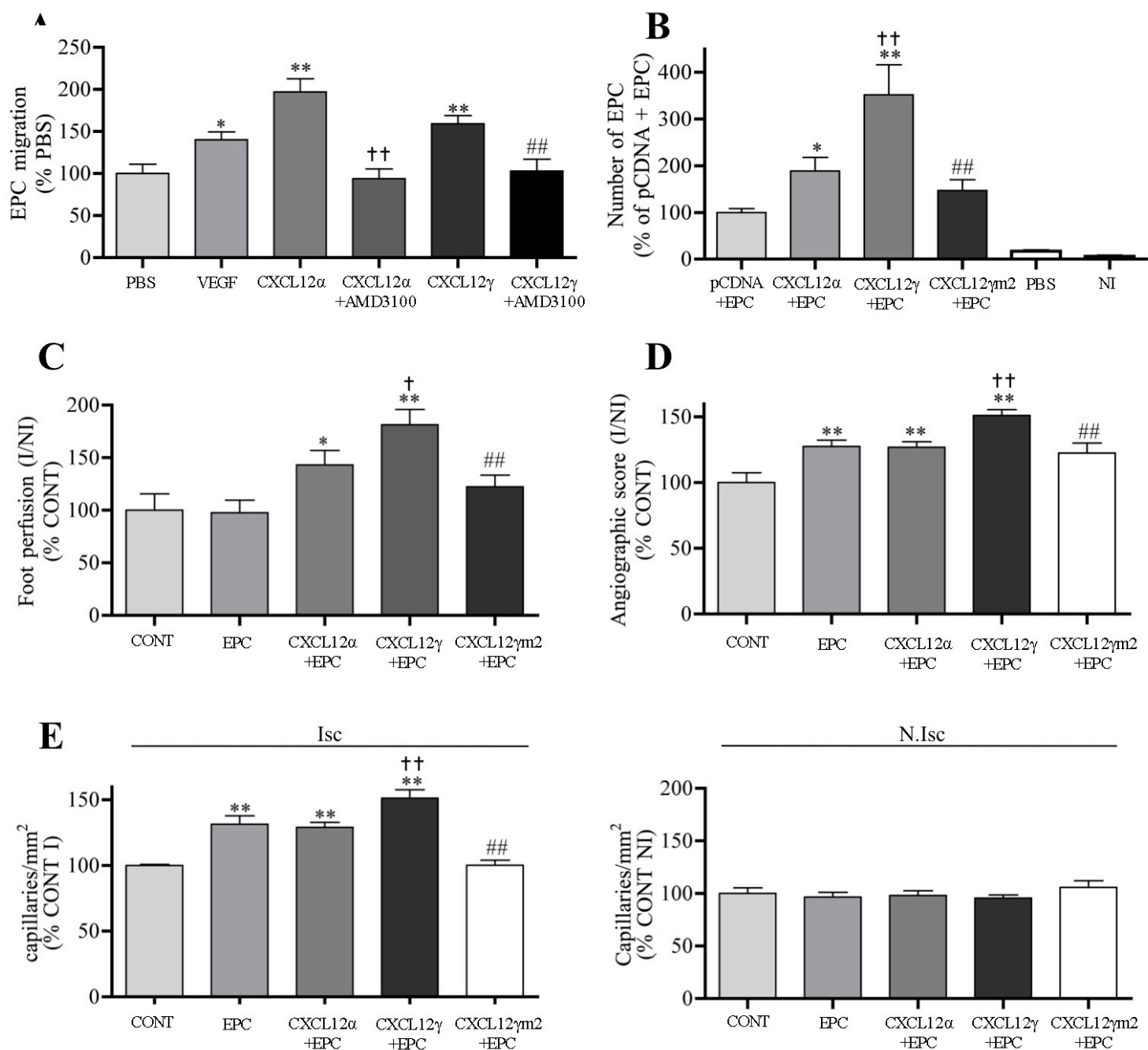


C



D





III. Article 3 : Role of miR-21 in the Proangiogenic Effect of Human Multipotent Cardiovascular Progenitors

En préparation

Adèle Richart, Xavier Loyer, Tui Néri, Michel Pucéat,
Jean-Sébastien Silvestre.

Malgré les traitements et les techniques chirurgicales actuels, les maladies ischémiques périphériques restent un problème majeur pour un grand nombre de patients dont l'amputation du membre lésé ne peut être évitée ; de nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires. L'une d'elle, actuellement en cours de développement, est celle basée sur l'utilisation de cellules souches adultes qui, de part leurs capacités d'auto-renouvellement, de prolifération, de différenciation et leur activité paracrine, sont d'excellents activateurs de la revascularisation post-ischémique. Cependant, malgré leur efficacité prouvée sur de nombreux modèles pathologiques animaux, les résultats obtenus chez l'homme sont très variables et restent dans l'ensemble insuffisants^{158 159 160}. Il semble que ces cellules souches adultes présentent une faible capacité de différenciation et un potentiel thérapeutique atténué par les facteurs de risques cardiovasculaires comme le diabète, le tabac et/ou l'âge¹⁷⁸. A l'inverse, les cellules souches embryonnaires pluripotentes (CSE) n'ayant pas subi l'influence néfaste de facteurs environnementaux et ayant une capacité de différenciation et de prolifération quasi-illimitée, offrent un large spectre de possibilités quand à leur utilisation en thérapie cellulaire. L'intérêt majeur des CSE est de pouvoir assez aisément les dériver *in vitro* en tous les types de progéniteurs et d'augmenter ainsi la proportion de cellules d'intérêt différenciées au sein du tissu ischémique. En effet, obtenir des progéniteurs endothéliaux dérivés de CSE (CSE-CE), par exemple, est plus facile que d'isoler des CPE à partir de BM-

MNC de patients (BM-CE) ¹⁹⁵. Les CSE-CE sécrètent d'ailleurs d'avantage de facteurs pro-angiogéniques que les BM-CE et leurs capacités à promouvoir l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* ont été démontrées ^{195 193}. Cependant, l'effet de ces progéniteurs reste relativement limité de part leur engagement dans une lignée strictement endothéliale, et il a été montré qu'injecter des progéniteurs de cellules murales en plus des CSE-EC est bien plus efficace pour promouvoir la revascularisation post-ischémique ¹⁹³. L'intérêt de notre travail repose donc sur l'utilisation de progéniteurs cardiovasculaires multipotents dérivés de CSE (CSE SSEA-1+) qui sont capables de se différencier en progéniteurs de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses. En effet, traiter les CSE pluripotentes avec du BMP2 (Bone Morphogenic Protein 2) et Wnt3a permet d'engager ces cellules vers une lignée mésodermique et d'obtenir des progéniteurs cardiovasculaires multipotents caractérisés par l'expression d'Oct-4, MESP-1 (Mesoderm Posterior 1) et SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen 1). Ces progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1+ sont particulièrement efficaces et ont été retrouvés, deux mois après leur injection, incorporés dans le myocarde des primates exprimant soit des marqueurs de cellules endothéliales, soit de cellules musculaires lisses ou de cardiomyocytes ¹⁹⁴.

L'objectif de ce troisième travail a été de mettre en évidence l'efficacité d'une thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des progéniteurs cardiovasculaires multipotents SSEA-1+ dérivés de cellules souches embryonnaires pluripotentes pour traiter l'ischémie du membre inférieur et de comprendre les mécanismes à l'origine de leur efficacité.

- **Les progéniteurs cardiovasculaires multipotents SSEA-1⁺ potentialisent la revascularisation post-ischémique**

Contrairement aux cellules souches embryonnaires pluripotentes SSEA-1⁻, les progéniteurs multipotents SSEA-1⁺ potentialisent la revascularisation post-ischémique. En effet, 14 jours après l'injection de CSE SSEA-1⁺ en intra-musculaire dans la patte ischémique de souris immuno-déficientes, le score angiographique, les densités capillaires et artériolaires ainsi que la perfusion sanguine ont été améliorés. L'efficacité de ces cellules surprend notamment par le fait que l'injection de seulement 10.000 SSEA-1⁺ suffit pour observer une amélioration de la revascularisation comparable à celle de 100.000 CPE (cellules progénitrices endothéliales) ou 100.000 CSM (cellules souches mésenchymateuses).

De façon surprenante, nous avons également montré que traiter des souris à l'aide de progéniteurs engagés vers une lignée endothéliale (cellules SSEA-1⁺ traitées pendant une semaine au VEGF-A) ou de cellules musculaires lisses (cellules SSEA-1⁺ traitées pendant une semaine au PDGF-BB), n'est pas plus efficace que l'utilisation des progéniteurs cardiovasculaires multipotents SSEA-1⁺.

Le reste de ce travail a ensuite été consacré à la compréhension des mécanismes à l'origine de l'efficacité des CSE SSEA-1⁺.

- **Le miR-21 régule l'effet pro-angiogénique des progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1⁺**

Nous avons tout d'abord mis en évidence que l'inhibition de l'ensemble des micro-ARN (miR) des cellules SSEA-1⁺ par transfection de siRNA DICER, altèrent leurs capacités à promouvoir la revascularisation post-ischémique. L'analyse de l'expression des miR dans les cellules SSEA-1⁻ et SSEA-1⁺ nous a ensuite permis de cibler le miR-21. Nous avons alors montré que les CSE SSEA-1⁺ transfectées avec un anti-miR-21 perdent leurs capacités à

promouvoir *in vivo* la régénération vasculaire et à former *in vitro* des tubes vasculaires en matrigel. Un suivi par imagerie *in vivo* (VISEN) des cellules injectées dans la patte ischémique de souris a également montré une diminution de la survie des CSE SSEA-1+ transfectées avec de l'anti-miR-21 par rapport aux CSE SSEA-1+ contrôles.

Afin de confirmer que le miR-21 est nécessaire à l'effet pro-angiogénique des cellules souches, nous avons créé des souris chimères à partir de souris invalidées pour le miR-21 (mir-21^{-/-}). Des souris sauvages ou mir-21^{-/-} ont été irradiées létalement et retransplantées avec de la moelle de souris mir-21^{-/-} ou sauvages. Nous avons alors mis en évidence que les souris sauvages ayant une moelle osseuse mir-21^{-/-} présentent une revascularisation diminuée par rapport aux souris sauvages. A l'inverse, les souris mir-21^{-/-} ayant une moelle osseuse normale revascularisent nettement mieux que les souris mir-21^{-/-}. Ainsi, la présence du miR-21 dans les cellules souches de la moelle osseuse est déterminante pour promouvoir la régénération vasculaire post-ischémique.

DISCUSSION

Les trois travaux effectués au cours de cette thèse ont permis de révéler une partie des mécanismes qui contrôlent la mobilisation et le recrutement des cellules souches, et de souligner l'intérêt d'un traitement basé sur l'administration de progéniteurs cardiovasculaires multipotents pour traiter l'ischémie critique des membres inférieurs.

I. Résultats généraux obtenus

a. Stimuler la mobilisation et le recrutement des cellules souches originaires de la moelle osseuse favorise la revascularisation post-ischémique

Si de précédentes études avaient déjà suggéré que les catécholamines régulent la mobilisation des cellules originaires de la moelle osseuse ces travaux de thèse révèlent leur importance pour promouvoir la revascularisation post-ischémique et mettent en lumière leur mécanisme d'action^{105 106}. En effet, le rôle de la dopamine (DA) était controversé et décrit comme pouvant inhiber la mobilisation des cellules progénitrices endothéliales (CPE) via son récepteur D2, mais également activer la mobilisation des cellules Sca-1+cKit+Lin- via son récepteur D5^{106 107}. Nos résultats précisent que l'activation de la voie β 2-adrénergique et des récepteurs D1/D5 stimule la mobilisation des cellules médullaires alors que celle du récepteur D2 l'inhibe ; la signalisation induite par D1/D5 étant majoritaire dans le contexte de l'ischémie périphérique puisque notre injection systémique de DA favorise la mobilisation et la revascularisation. Nous avons également montré que l'effet des catécholamines dépend de la eNOS puisque ni la DA ni la NE favorisent la revascularisation post-ischémique des souris invalidées pour la eNOS (eNOS^{-/-}). De plus, nous avons précisé le rôle de la eNOS sur la mobilisation des cellules souches depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine. En effet, nous avons observé que des souris chimères eNOS^{-/-} irradiées puis retransplantées avec

de la moelle osseuse de souris sauvages présentent, dès les premiers jours suivants l'ischémie, d'avantage de progéniteurs CD34+ dans leur moelle osseuse et nettement moins dans le compartiment sanguin par rapport aux souris contrôles. Cependant, cette rétention des progéniteurs dans la moelle osseuse n'explique qu'en partie la baisse de revascularisation post-ischémique observée chez ces souris chimères puisque la eNOS est également absente en périphérie et il n'est pas exclu qu'elle puisse jouer un rôle sur le recrutement et/ou l'activité des progéniteurs au niveau du tissu lésé.

Si les catécholamines ou autres cytokines qui agissent directement au niveau de la moelle osseuse sont essentielles pour permettre la mobilisation des cellules souches médullaires dans la circulation sanguine, les travaux réalisés dans cette thèse soulignent également l'importance du chimiotactisme exercée par les chimiokines, et en particulier par CXCL12. Au vu de nos résultats, il est clair que le gradient de concentration de CXCL12, qui se fait entre la moelle osseuse, la circulation sanguine et le tissu lésé, régit la migration cellulaire. Les souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}*, dont les capacités d'adhésion de CXCL12 aux héparan-sulfates (HS) ont été invalidées, présentent une augmentation du nombre de cellules CD34+ circulantes et un taux plasmatique de CXCL12 élevé. Les molécules de CXCL12 n'ayant plus les mêmes capacités à adhérer à la matrice extracellulaire se retrouvent majoritairement sous forme soluble, dans la circulation sanguine. Ainsi, le gradient de concentration entre la moelle osseuse et le compartiment sanguin est accentué et favorise la mobilisation des cellules CD34+ vers la circulation sanguine. Il est important de noter que ce taux élevé de cellules CD34+ dans le sang sous-entend un meilleur recrutement dans le tissu ischémique et donc une amélioration de la revascularisation post-ischémique. De plus, il semble que le recrutement des cellules médullaires soit plutôt régit par l'axe CCL2/CCR2, et que CXCL12 régulerait d'avantage leur retenue au sein du tissu ischémique. En effet, de précédents travaux ont montré que l'expression des ARNm de CCL2 dans le muscle

augmente dès le 1^{er} jour suivant l'ischémie pour revenir à un taux basal au 7^{ème} jour. Ceci suggère que l'axe CCL2/CCR2 participe à l'infiltration massif des cellules durant la phase aiguë de l'ischémie ⁷². Au contraire, nos résultats révèlent que les ARNm de CXCL12 sont principalement exprimés au 6^{ème} jour suivant l'ischémie, montrant ainsi un rôle plus tardif, dans la retenue et la survie des cellules au sein du tissu ischémique. Malgré ces caractéristiques plutôt favorables au recrutement des cellules médullaires, les souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* présentent une régénération vasculaire fortement altérée par rapport aux contrôles ; ceci souligne d'autant plus l'importance des interactions CXCL12/HS pour les fonctions biologiques de CXCL12.

Ces souris *Cxcl12^{Gagtm/Gagtm}* soulèvent également des questions quand à l'importance des liaisons CXCL12/HS au cours du développement embryonnaire. En effet, les souris déficientes pour CXCL12 ou CXCR4 présentent de multiples défauts d'organogenèse et meurent en périnatal, alors qu'aucune anomalie développementale n'a été observée chez nos souris mutées ^{196 197}. Ceci suggère que les interactions CXCL12/HS, et donc le gradient chimioattractant formé par CXCL12, ne prennent leur importance qu'à l'âge adulte, dans un contexte pathologique qui implique une migration cellulaire entre différents organes.

Nous avons montré que l'isoforme CXCL12 γ , grâce à sa plus forte affinité pour les HS que CXCL12 α , permet de recruter un plus grand nombre de cellules originaires de la moelle osseuse dans le muscle ischémique, mais ne semble pas attirer un type cellulaire en particulier. *In vitro*, nous confirmons que CXCL12 γ et CXCL12 α ont la même affinité pour le récepteur CXCR4 et les mêmes capacités à faire migrer les CPE, soulignant ainsi l'importance du gradient formé *in vivo* par CXCL12 γ pour recruter d'avantage de cellules CXCR4+. Cependant, ces résultats ne prennent pas en compte l'existence du deuxième récepteur à CXCL12, CXCR7 dont le rôle reste encore très mal décrit. Certaines études montrent que CXCR7 agit comme un corécepteur de CXCR4 dont il inhibe la voie de signalisation protéine

G-dépendante^{135 136} alors que d'autres travaux révèlent que CXCR7 a un rôle indépendant de CXCR4 sur la survie des cellules^{134 137 198 199}. Des études ont également démontré que les CPE expriment CXCR7 et que ce récepteur est déterminant pour leurs capacités pro-angiogéniques induites par CXCL12. En effet, tout comme CXCR4, CXCR7 module l'adhésion des CPE aux HUVECS, leur migration trans-endothéliale ainsi que leurs capacités à former des tubes en matrigel¹⁹⁹. Il est donc envisageable que CXCR7 module le recrutement et l'activité des cellules souches mobilisées dans le tissu ischémique. L'hypothèse selon laquelle les isoformes de CXCL12 n'aient pas la même affinité pour CXCR7 n'est pas à exclure et il serait intéressant de regarder l'impact des interactions CXCL12/CXCR7 sur la revascularisation post-ischémique.

b. Incorporation et survie des cellules souches recrutées

Si la participation des cellules progénitrices aux processus de revascularisation post-ischémique est admise de tous, leurs mécanismes d'action au sein du tissu ischémique restent encore débattus. La question de l'intégration des progéniteurs dans les vaisseaux néoformés et de leur différenciation en cellules vasculaires matures et fonctionnelles n'est pas encore résolue. Des travaux ont notamment montré que les cellules souches n'incorporent pas réellement les structures vasculaires suite à une ischémie périphérique mais qu'elles s'accumulent autour des collatérales et auraient plutôt un rôle de cellules de soutien¹⁵⁰. Les résultats obtenus dans cette thèse à l'aide des cellules souches embryonnaires humaines (CSE) confirment la difficulté d'identifier une réelle intégration des progéniteurs dans les vaisseaux néoformés. En effet, 6 jours après leur injection en intramusculaire dans le tissu ischémique de souris immunodéficientes, nous avons retrouvé nos CSE humaines au sein du tissu mais la plupart d'entre elles étaient à proximité d'un vaisseau et il fût extrêmement rare d'en trouver exprimant un marqueur de différenciation comme le CD31. Pourtant, nos résultats *in vitro*

montrent que les CSE mises en présence d'HUVECS (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont capables de former et d'incorporer des structures vasculaires en matrigel. Une récente étude dans laquelle 3.10^6 progéniteurs endothéliaux dérivés de CSE humaines (hCSE-CE) ont été injectés en intramusculaire dans des souris ayant une ischémie critique périphérique a également permis d'observer, 4 semaines après leur administration, l'incorporation des hCSE-CE dans des structures vasculaires de type capillaire. Cette équipe affirme d'ailleurs qu'un quart des capillaires quantifiés au sein du tissu ischémique étaient des vaisseaux hybrides souris/humain, ce qui, au vu des résultats obtenus dans d'autres équipes paraît un peu surprenant ¹⁹². Toutefois, cela révèle que nos résultats ont peut-être été limités par un nombre insuffisant de cellules injectées (10.000 CSE injectées en trois muscles différents et observation faite uniquement sur le gastrocnemius), par la technique d'observation des cellules (immuno-histochimie) et/ou par le temps post-injection auquel l'analyse a été faite. Néanmoins, il est fort probable que l'incorporation des cellules souches dans les structures vasculaires soit extrêmement rare et qu'elles agissent plutôt sur la revascularisation post-ischémique par un effet paracrine. En effet, l'administration de milieu de culture concentré de hCSE-CE suffit à améliorer la cicatrisation et la vascularisation ²⁰⁰. Une équipe a également traité des souris ayant une ischémie critique périphérique avec des hCSE-EC encapsulées dans du matrigel afin d'éviter leur incorporation au tissu et une éventuelle prolifération tumorale, et a ainsi montré que leurs facteurs humoraux suffisent à promouvoir la revascularisation post-ischémique ²⁰¹.

Les conclusions sur le devenir des cellules souches dans le tissu ischémique varient donc selon le mode expérimental, l'administration des cellules et le type cellulaire. Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de différences ni de survie, ni d'efficacité entre les progéniteurs multipotents cardiovasculaires SSEA-1+, les progéniteurs endothéliaux et les progéniteurs de cellules musculaires lisses. Cependant, une analyse plus poussée de leur

différenciation et de leur intégration devrait être faite sur d'autres modèles expérimentaux afin d'identifier d'éventuelles différences de mécanismes d'action et/ou d'efficacité entre ces différents progéniteurs plus ou moins engagés vers une lignée cellulaire.

Ces travaux de thèse apportent également des précisions supplémentaires sur les mécanismes qui permettent la vasculogénèse. Nous avons, en effet, montré que les catécholamines stimulent la différenciation des cellules mononuclées originaires de la moelle osseuse (BM-MNC) en cellules progénitrices à phénotype endothéliale et active leur sécrétion de NO. Nous avons également mis en avant l'importance des micro-ARN (miR), et plus particulièrement du miR-21, pour la survie des cellules souches dans le tissu ischémique et pour leur efficacité à promouvoir la revascularisation post-ischémique. Le rôle du miR-21 dans l'angiogénèse était jusque là controversé. En effet, une étude basée sur un modèle tumorale a montré que le miR-21 active la production de VEGF via HIF-1 α et aurait donc un effet pro-angiogénique ⁵⁷. Au contraire, d'autres travaux ont montré que les progéniteurs angiogéniques (APC) de patients atteints de pathologies coronariennes présentent un taux intracellulaire de miR-21 très élevé qui serait à l'origine de l'augmentation du taux de réactifs de l'oxygène et de la perte des capacités migratoires de ces cellules ²⁰². De même, il semble que l'augmentation du miR-21 dans les CPE de jeunes souris induit une augmentation de leur sénescence et une perte de leurs capacités pro-angiogéniques ¹⁸³. Nos résultats révèlent que dans un contexte murin d'ischémie critique périphérique, le miR-21 est nécessaire à la revascularisation et qu'inhiber le miR-21 dans les CSE SSEA-1+ limite leurs capacités pro-vasculogéniques. Cependant, nous avons également trouvé que les CSE SSEA-1⁻, qui n'ont pas d'effet pro-angiogénique dans notre modèle d'étude, ont un taux de miR-21 plus élevé que les CSE SSEA-1+. Il est possible qu'un certain niveau d'expression de miR-21 soit nécessaire pour activer la voie de HIF-1 α et permettre un effet pro-angiogénique, alors qu'un excès de miR-21 induirait plutôt l'activation d'une voie anti-angiogénique telle que celle des

réactifs de l'oxygène. Ceci confirmerait l'idée qu'un miR pouvant inhiber des molécules activatrices et inhibitrices de différentes voies de signalisation, son effet sur un processus biologique entier dépend énormément de son taux intracellulaire. L'effet d'un miR peut également dépendre du type cellulaire dans lequel il est exprimé et de son degré de différenciation. En effet, bien que le cluster miR-17-92 régule l'angiogenèse et l'intégrité vasculaire, il a été montré qu'il n'a aucun impact sur la différenciation des cellules souches embryonnaires murines en cellule à phénotype endothéliale ²⁰³. Il est donc possible que le miR-21 soit néfaste pour les capacités pro-angiogéniques des CPE mais essentiel les fonctions régénératrices des CSE SSEA-1+ ¹⁸³. Il serait intéressant de comparer l'effet du miR-21 sur les capacités pro-angiogéniques de différents progéniteurs de la lignée endothéliale, notamment sur les progéniteurs multipotents cardiovasculaires SSEA-1+ et les progéniteurs endothéliaux.

II. Perspectives thérapeutiques

Au vu du rôle important des cellules souches dans les processus de revascularisation post-ischémique, de nombreuses stratégies thérapeutiques cherchent actuellement à favoriser leur recrutement dans le tissu ischémique et/ou leur efficacité.

a. Activer la mobilisation des cellules souches

Le G-CSF (Granulocyte-Colony-Stimulating Factor) est actuellement le facteur le plus connu pour activer la mobilisation des cellules souches originaires de la moelle osseuse. En effet, il a été montré qu'il permet d'augmenter les taux circulants de cellules CD34+CD133+ et de CPE en modulant l'axe CXCL12/CXCR4 ¹⁰³. Le G-CSF est d'ailleurs couramment

utilisé chez l'homme dans le cadre d'essais cliniques visant à tester l'efficacité de l'injection autologue de cellules souches adultes isolées à partir du sang périphérique car il permet d'augmenter leurs taux circulants^{204 205 206 207}. Les travaux de cette thèse proposent une autre alternative basée sur l'utilisation des catécholamines dont nous avons montré leurs effets sur la mobilisation des cellules souches et inflammatoires. Il a été montré dans un modèle de rat diabétique que le faible taux de CPE présents dans la circulation sanguine résulte d'une dénervation sympathique au niveau de la moelle osseuse²⁰⁸. Des agonistes aux récepteurs β 2-adrénergiques ou D1/D5 pourraient donc notamment être utilisées chez les personnes diabétiques afin de contrer leur neuropathie et permettre une meilleure mobilisation de leur CPE.

b. Potentialiser le recrutement et la survie des cellules souches dans le tissu

Les résultats obtenus chez l'homme sur l'utilisation des cellules souches adultes pour traiter l'ischémie périphérique sont assez mitigés et révèlent que cette stratégie thérapeutique mérite d'être améliorée. La question du recrutement et du maintien des cellules dans le tissu ischémique est évidente pour leur bonne efficacité. En ce sens, la chimiokine CXCL12 semble être la molécule la mieux adaptée puisqu'elle est fortement exprimée dans des conditions hypoxiques, attire et retient les cellules CXCR4+ dans le tissu ischémique, et promeut la revascularisation post-ischémique. Cependant, du fait de leur pathologie et de leur âge bien souvent avancé, les patients présentent souvent un défaut d'expression de CXCL12 ; ce qui limite l'efficacité d'un traitement par thérapie cellulaire. Il a été montré que l'injection de CXCL12 pour contrer ce problème n'était pas très relevant puisque ces molécules sont rapidement inactivées par des métalloprotéinases telles que MMP-2²⁰⁹. Une équipe a même créé une molécule recombinante de CXCL12 pour limiter cette dégradation et augmenter sa demi-vie, et montré que sous cette forme, CXCL12 améliore d'avantage la perfusion sanguine

de souris ayant une ischémie périphérique ²¹⁰. Il est important de noter que la plupart des études faites sur CXCL12 ne prennent pas en compte l'existence des différents isoformes ou ne considèrent que l'isoforme CXCL12 α . Or, nous avons clairement montré dans ces travaux de thèse que ces isoformes ont des capacités différentes à promouvoir la revascularisation post-ischémique et que CXCL12 γ permet d'attirer d'avantage de cellules originaires de la moelle osseuse que CXCL12 α . En effet, grâce à sa chaîne C-terminale, CXCL12 γ est moins exposé à la dégradation par les MMPs et, de part sa grande capacité à se lier aux HS, est moins diffus dans la circulation ; ceci augmente donc sa demi-vie et renforce son efficacité ¹²⁵. L'utilisation de CXCL12 γ pourrait donc être une solution aux problèmes rencontrés lors des essais cliniques précédents. Associer CXCL12 γ à une thérapie cellulaire permettrait d'augmenter le recrutement et la survie des cellules souches au sein du tissu ischémique et favoriser ainsi la régénération vasculaire. D'ailleurs, nous avons montré dans notre modèle d'ischémie périphérique murin que l'injection concomitante de CXCL12 γ et de CPE était plus efficace pour promouvoir la revascularisation post-ischémique que celle de CXCL12 α et CPE ou celle de CPE seules.

Au vu de l'importance des liaisons CXCL12/HS pour la disponibilité, la demi-vie et l'efficacité de CXCL12 γ , il serait intéressant de transposer cette capacité d'adhésion à la matrice extracellulaire à d'autres molécules. En effet, le VEGF notamment, connu pour être particulièrement impliqué dans l'angiogenèse a montré des résultats très décevants lors des essais cliniques visant à traiter les maladies ischémiques périphériques chez l'homme. Créer une protéine de VEGF recombinante comportant en plus la chaîne C-terminale de CXCL12 γ permettrait d'augmenter sa biodisponibilité et donc ses capacités à promouvoir l'angiogenèse.

c. Les cellules souches embryonnaires humaines comme thérapie cellulaire

L'utilisation de cellules souches embryonnaires (CSE) humaines en thérapie cellulaire semble être une bonne alternative aux limites rencontrées avec les cellules souches adultes. En effet, étant isolées à partir d'embryons, ces cellules ne présentent pas d'altération de leur efficacité due aux facteurs extérieurs comme l'âge ou le tabac ¹⁷⁸. Elles sont également capables de proliférer de façon quasi-illimitée et peuvent se différencier *in vitro* en tous les types de progéniteurs et de cellules différenciées. Pourtant, les premières utilisations de CSE en thérapie cellulaire sur des modèles animaux ont laissé des doutes quand à leurs réelles capacités de différenciation en cellules d'intérêt et d'incorporation dans le tissu ischémique ²⁰⁰ ²⁰¹ ²¹¹. En fait, l'intérêt majeur des CSE réside essentiellement dans le fait qu'il est assez aisé de les dériver *in vitro* en progéniteurs spécialisés et d'augmenter ainsi la proportion de cellules d'intérêt différenciées au sein du tissu lésé. En effet, obtenir des progéniteurs endothéliaux dérivés de CSE (CSE-CE), par exemple, est plus facile que d'isoler des CPE à partir de BM-MNC de patients (BM-CE) ¹⁹⁵. Plusieurs techniques de culture cellulaire ont d'ailleurs déjà été développées afin d'obtenir ces CSE-CE. Leurs capacités pro-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* ont été démontrées et il semble qu'elles sécrètent d'avantage de facteurs pro-angiogéniques que les BM-CE ¹⁹³ ¹⁹⁵ ²⁰¹ ¹⁹². Cependant, l'effet de ces progéniteurs reste relativement limité de part leur engagement dans une lignée strictement endothéliale, et il a été montré qu'injecter des progéniteurs de cellules murales en plus des CSE-EC est bien plus efficace pour promouvoir la revascularisation post-ischémique ¹⁹³. L'intérêt de notre travail repose donc sur l'utilisation de progéniteurs cardiovasculaires multipotents dérivés de CSE (CSE SSEA-1+) qui sont capables de se différencier en progéniteurs de cellules endothéliales et en progéniteurs de cellules musculaires lisses. Un précédent travail avait d'ailleurs montré que, deux mois après leur injection dans le myocarde de primates ayant un infarctus induit, ces CSE SSEA-1+ ont été retrouvées incorporées au tissu et exprimaient soit des marqueurs

de cellules endothéliales, soit de cellules musculaires lisses ou de cardiomyocytes¹⁹⁴. Ces cellules ont donc été capables de se différencier *in vivo* en trois types cellulaires et de participer à la régénération vasculaire et tissulaire. La plasticité de ces progéniteurs cardiovasculaires facilite donc certainement leur action et leur intégration au sein du tissu, et explique en partie leur efficacité à promouvoir la revascularisation post-ischémique dans notre modèle murin d'ischémie périphérique. Ces travaux de thèse montrent d'ailleurs que ces CSE SSEA-1⁺ sont plus efficaces que les EPC, les CSM ou encore les BM-MNC pour promouvoir la revascularisation post-ischémique et qu'injecter dix fois moins de CSE suffit pour observer les mêmes effets.

Les capacités prolifératives des CSE soulèvent le problème du développement de tératomes au sein du tissu. Dans ces travaux de thèse, nous avons utilisé deux types de CSE : des CSE pluripotentes (CSE SSEA-1⁻) qui n'améliorent pas la revascularisation post-ischémique dans notre modèle, et des CSE multipotentes (CSE SSEA-1⁺) dérivées des CSE SSEA-1⁻ qui sont engagées vers une lignée mésodermique et qui potentialisent la régénération vasculaire. Cette perte de pluripotence marquée par l'expression du marqueur SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen 1) semble importante pour le développement tumoral. En effet, des études préliminaires ont montré que les CSE SSEA-1⁻ développent des tératomes chez le primate alors qu'aucun développement tumoral n'a été observé avec des CSE SSEA-1⁺¹⁹⁴. Même si des études complémentaires doivent être réalisées et tous les problèmes éthiques et réglementaires soulevés par l'utilisation de CSE humaines résolus, les progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1⁺ semblent être suffisamment efficaces et sûrs pour pouvoir envisager, sur le long terme, de les utiliser en thérapie régénératrice chez l'homme.

REFERENCES

1. Hiatt WR. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med*. 2001;344:1608-1621
2. Piazza G, Creager MA. Thromboangiitis obliterans. *Circulation*. 2010;121:1858-1861
3. Quick CR, Cotton LT. The measured effect of stopping smoking on intermittent claudication. *Br J Surg*. 1982;69 Suppl:S24-26
4. Kirk G, McLaren M, Muir AH, Stonebridge PA, Belch JJ. Decrease in p-selectin levels in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial occlusive disease after lipid-lowering treatment. *Vasc Med*. 1999;4:23-26
5. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--i: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet trialists' collaboration. *BMJ*. 1994;308:81-106
6. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86
7. Schillinger M, Minar E. Percutaneous treatment of peripheral artery disease: Novel techniques. *Circulation*. 2012;126:2433-2440
8. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9:653-660
9. Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13:29-37
10. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of hif-alpha to the von hippel-lindau ubiquitylation complex by o2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292:468-472
11. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. Elegans egl-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate hif by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107:43-54
12. Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep*. 2006;7:41-45
13. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. Hif-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003;112:645-657

14. Kajiwarra H, Luo Z, Belanger AJ, Urabe A, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Mochizuki S, Gregory RJ, Jiang C. A hypoxic inducible factor-1 alpha hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats. *J Gene Med.* 2009;11:390-400
15. Loinard C, Ginouves A, Vilar J, Cochain C, Zouggari Y, Recalde A, Duriez M, Levy BI, Pouyssegur J, Berra E, Silvestre JS. Inhibition of prolyl hydroxylase domain proteins promotes therapeutic revascularization. *Circulation.* 2009;120:50-59
16. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219:983-985
17. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation.* 1994;90:II228-234
18. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* 1994;93:662-670
19. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:789-791
20. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (vegf) isoforms: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound vegf. *Mol Biol Cell.* 1993;4:1317-1326
21. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376:62-66
22. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins bcl-2 and a1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273:13313-13316
23. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998;92:735-745
24. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 1999;126:3015-3025
25. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A,

- Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001;7:575-583
26. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of plgf in the intra- and intermolecular cross talk between the vegf receptors flt1 and flk1. *Nat Med.* 2003;9:936-943
27. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, Levy BI. Vascular endothelial growth factor-b promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res.* 2003;93:114-123
28. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor b, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2576-2581
29. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. Flt1 and its ligands vegfb and plgf: Drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer.* 2008;8:942-956
30. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:159-178
31. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: Acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res.* 2002;90:966-973
32. Murakami M, Nguyen LT, Hatanaka K, Schachterle W, Chen PY, Zhuang ZW, Black BL, Simons M. Fgf-dependent regulation of vegf receptor 2 expression in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:2668-2678
33. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tanii M, Nakano T, Egashira K, Takehara T, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. Nonendothelial mesenchymal cell-derived mcp-1 is required for fgf-2-mediated therapeutic neovascularization: Critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2483-2489
34. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in pdgf-b-deficient mice. *Science.* 1997;277:242-245

35. Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of pdgf-b and pdgfr-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126:3047-3055
36. Kupatt C, Hinkel R, Pfosser A, El-Aouni C, Wuchrer A, Fritz A, Globisch F, Thormann M, Horstkotte J, Lebherz C, Thein E, Banfi A, Boekstegers P. Cotransfection of vascular endothelial growth factor-a and platelet-derived growth factor-b via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:414-422
37. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of pdgf-bb and fgf-2. *Nat Med*. 2003;9:604-613
38. Said SS, Pickering JG, Mequanint K. Advances in growth factor delivery for therapeutic angiogenesis. *J Vasc Res*. 2013;50:35-51
39. Li X, Tjwa M, Moons L, Fons P, Noel A, Ny A, Zhou JM, Lennartsson J, Li H, Luttun A, Ponten A, Devy L, Bouche A, Oh H, Manderveld A, Blacher S, Communi D, Savi P, Bono F, Dewerchin M, Foidart JM, Autiero M, Herbert JM, Collen D, Heldin CH, Eriksson U, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by pdgf-cc via effects on endothelial cells and their progenitors. *J Clin Invest*. 2005;115:118-127
40. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101:2567-2578
41. Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1156-1161
42. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100:3131-3139
43. Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, Presta M. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bfgf. *Circ Res*. 1997;80:845-852
44. Namba T, Koike H, Murakami K, Aoki M, Makino H, Hashiya N, Ogihara T, Kaneda Y, Kohno M, Morishita R. Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation*. 2003;108:2250-2257

45. Langille BL, Brownlee RD, Adamson SL. Perinatal aortic growth in lambs: Relation to blood flow changes at birth. *Am J Physiol*. 1990;259:H1247-1253
46. Brakebusch C, Fassler R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J*. 2003;22:2324-2333
47. Silvestre JS, Thery C, Hamard G, Boddaert J, Aguilar B, Delcayre A, Houbron C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Levy B, Tedgui A, Amigorena S, Mallat Z. Lactadherin promotes vegf-dependent neovascularization. *Nat Med*. 2005;11:499-506
48. Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation*. 2004;109:1041-1047
49. Lemarie CA, Esposito B, Tedgui A, Lehoux S. Pressure-induced vascular activation of nuclear factor-kappaB: Role in cell survival. *Circ Res*. 2003;93:207-212
50. van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res*. 2011;108:219-234
51. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*. 2011;469:336-342
52. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*. 2005;280:9330-9335
53. Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, Sluijter JP, Hoefer I, Pasterkamp G, Bode C, Moser M. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2011;123:999-1009
54. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;324:1710-1713
55. van Solingen C, Seghers L, Bijkerk R, Duijs JM, Roeten MK, van Oeveren-Rietdijk AM, Baelde HJ, Monge M, Vos JB, de Boer HC, Quax PH, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1577-1585
56. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces cxcl12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2:ra81

57. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L, Jiang BH. Mir-21 induced angiogenesis through akt and erk activation and hif-1alpha expression. *PLoS One*. 2011;6:e19139
58. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2000;275:26765-26771
59. Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI. Angiotensin ii angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest*. 2002;82:747-756
60. Silvestre JS, Tamarat R, Senbonmatsu T, Icchiki T, Ebrahimian T, Iglarz M, Besnard S, Duriez M, Inagami T, Levy BI. Antiangiogenic effect of angiotensin ii type 2 receptor in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res*. 2002;90:1072-1079
61. Gohlke P, Kuwer I, Schnell A, Amann K, Mall G, Unger T. Blockade of bradykinin b2 receptors prevents the increase in capillary density induced by chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:478-482
62. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin b(2) receptor pathway. *Circ Res*. 2001;89:678-683
63. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U, Shou M, Zbinden S, Fuchs S, Kornfeld H, Epstein SE, Burnett MS. Cd8+ t lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting cd4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation*. 2006;113:118-124
64. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2411-2419
65. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, Levy BI. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res*. 2000;87:448-452
66. Mallat Z, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Lecomte-Raclet L, Corbaz A, Clergue M, Duriez M, Barateau V, Akira S, Tedgui A, Tobelem G, Chvatchko Y, Levy BI. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates ischemia-induced neovascularization in mice hindlimb. *Circ Res*. 2002;91:441-448

67. Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, Iwasaka T, Matsubara H. Mechanism for il-1 beta-mediated neovascularization unmasked by il-1 beta knock-out mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:469-480
68. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking cc-chemokine receptor-2. *Circ Res.* 2004;94:671-677
69. Voskuil M, van Royen N, Hoefer IE, Seidler R, Guth BD, Bode C, Schaper W, Piek JJ, Buschmann IR. Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using mcp-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H1422-1428
70. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. Vegfr-1-selective vegf homologue plgf is arteriogenic: Evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res.* 2003;92:378-385
71. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19:71-82
72. Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Recalde A, Richart AL, Loinard C, Zouggari Y, Guerin C, Duriez M, Combadiere B, Poupel L, Levy BI, Mallat Z, Combadiere C, Silvestre JS. Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2010;88:186-195
73. Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A, Levy BI. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2008;78:242-249
74. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, Kojima H, Iwasaka T. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation.* 2002;106:2019-2025
75. Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: Cooperative interaction between a2b and a3 adenosine receptors. *Circ Res.* 2003;92:485-492
76. Kwon JS, Kim YS, Cho AS, Cho HH, Kim JS, Hong MH, Jeong SY, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Kang JC, Ahn Y. The novel role of mast cells in the microenvironment of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:814-825
77. Rork TH, Wallace KL, Kennedy DP, Marshall MA, Lankford AR, Linden J. Adenosine a2a receptor activation reduces infarct size in the isolated, perfused mouse heart by inhibiting resident cardiac mast cell degranulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H1825-1833

78. Heissig B, Rafii S, Akiyama H, Ohki Y, Sato Y, Rafael T, Zhu Z, Hicklin DJ, Okumura K, Ogawa H, Werb Z, Hattori K. Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through vegf release from mast cells and mmp-9-mediated progenitor cell mobilization. *J Exp Med*. 2005;202:739-750
79. Couffignal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in apoe^{-/-} mice. *Circulation*. 1999;99:3188-3198
80. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in cd4-knockout mice. *Circulation*. 2003;108:205-210
81. Hellingman AA, Zwaginga JJ, van Beem RT, Hamming JF, Fibbe WE, Quax PH, Geutskens SB. T-cell-pre-stimulated monocytes promote neovascularisation in a murine hind limb ischaemia model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;41:418-428
82. Zouggari Y, Ait-Oufella H, Waeckel L, Vilar J, Loinard C, Cochain C, Recalde A, Duriez M, Levy BI, Lutgens E, Mallat Z, Silvestre JS. Regulatory t cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation*. 2009;120:1415-1425
83. van Weel V, Toes RE, Seghers L, Deckers MM, de Vries MR, Eilers PH, Sipkens J, Schepers A, Eefting D, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH. Natural killer cells and cd4⁺ t-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2310-2318
84. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004;109:1543-1549
85. Ryu JC, Davidson BP, Xie A, Qi Y, Zha D, Belcik JT, Caplan ES, Woda JM, Hedrick CC, Hanna RN, Lehman N, Zhao Y, Ting A, Lindner JR. Molecular imaging of the paracrine proangiogenic effects of progenitor cell therapy in limb ischemia. *Circulation*. 2013;127:710-719
86. Aranguren XL, McCue JD, Hendrickx B, Zhu XH, Du F, Chen E, Pelacho B, Penuelas I, Abizanda G, Uriz M, Frommer SA, Ross JJ, Schroeder BA, Seaborn MS, Adney JR, Hagenbrock J, Harris NH, Zhang Y, Zhang X, Nelson-Holte MH, Jiang Y, Billiau AD, Chen W, Prosper F, Verfaillie CM, Luttun A. Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:505-514
87. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967

88. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of vegfr2(+)ac133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-174
89. Alev C, Ii M, Asahara T. Endothelial progenitor cells: A novel tool for the therapy of ischemic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15:949-965
90. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600
91. Rohde E, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells*. 2006;24:357-367
92. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760
93. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*. 2002;106:1199-1204
94. Merkulova-Rainon T, Broqueres-You D, Kubis N, Silvestre JS, Levy BI. Towards the therapeutic use of vascular smooth muscle progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 2012;95:205-214
95. Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Contreres JO, Boval B, Kraus-Berthier L, Tobelem G. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovasc Res*. 2004;62:176-184
96. Foubert P, Matrone G, Souttou B, Lere-Dean C, Barateau V, Plouet J, Le Ricousse-Roussanne S, Levy BI, Silvestre JS, Tobelem G. Coadministration of endothelial and smooth muscle progenitor cells enhances the efficiency of proangiogenic cell-based therapy. *Circ Res*. 2008;103:751-760
97. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of sdf-1, vegf, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:36-45; discussion 45-37
98. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by cxcl12-cxcr4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25:977-988
99. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires mmp-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625-637

100. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003;9:702-712
101. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9:1370-1376
102. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605
103. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5:434-438
104. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3:687-694
105. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell.* 2006;124:407-421
106. Chakroborty D, Chowdhury UR, Sarkar C, Baral R, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *J Clin Invest.* 2008;118:1380-1389
107. Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, Azaria Y, Resnick I, Hardan I, Ben-Hur H, Nagler A, Rubinstein M, Lapidot T. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol.* 2007;8:1123-1131
108. Chalothorn D, Zhang H, Clayton JA, Thomas SA, Faber JE. Catecholamines augment collateral vessel growth and angiogenesis in hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H947-959
109. Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Galasso G, Campanile A, Santulli G, Cipolletta E, Cerullo V, Cimini V, Altobelli GG, Piscione F, Priante O, Pastore L, Chiariello M, Salvatore F, Koch WJ, Trimarco B. Ischemic neoangiogenesis enhanced by beta2-adrenergic receptor overexpression: A novel role for the endothelial adrenergic system. *Circ Res.* 2005;97:1182-1189
110. Seya Y, Fukuda T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K. Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2006;553:54-60

111. Pyne-Geithman GJ, Caudell DN, Cooper M, Clark JF, Shutter LA. Dopamine d2-receptor-mediated increase in vascular and endothelial nos activity ameliorates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in vitro. *Neurocrit Care*. 2009;10:225-231
112. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354:610-621
113. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF. Ccr2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:1192-1203
114. Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C. Expression of ccr2 by endothelial cells : Implications for mcp-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2085-2093
115. Selzman CH, Miller SA, Zimmerman MA, Gamboni-Robertson F, Harken AH, Banerjee A. Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1455-1461
116. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-a. *Blood*. 2005;105:1405-1407
117. Ryu J, Lee CW, Hong KH, Shin JA, Lim SH, Park CS, Shim J, Nam KB, Choi KJ, Kim YH, Han KH. Activation of fractalkine/cx3cr1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through vegf-a/kdr and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res*. 2008;78:333-340
118. Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, Kim CK, Lee H, Ha KS, Chung HT, Kwon YG. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the raf-1/mek/erk- and pi3k/akt/enos-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H2836-2846
119. Waeckel L, Mallat Z, Potteaux S, Combadiere C, Clergue M, Duriez M, Bao L, Gerard C, Rollins BJ, Tedgui A, Levy BI, Silvestre JS. Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the cxc chemokine receptor 3. *Circ Res*. 2005;96:576-582
120. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-b-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2305-2309
121. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, Matsushima K, Yoshida N, Springer TA, Kishimoto T. Molecular cloning and characterization of a murine pre-b-cell growth-stimulating factor/stromal cell-

- derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14726-14729
122. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (sdf1) gene. *Genomics*. 1995;28:495-500
123. Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, Muller HW. Cloning and characterization of sdf-1gamma, a novel sdf-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci*. 2000;12:1857-1866
124. Sadir R, Baleux F, Grosdidier A, Imberty A, Lortat-Jacob H. Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J Biol Chem*. 2001;276:8288-8296
125. Laguri C, Sadir R, Rueda P, Baleux F, Gans P, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H. The novel cxcl12gamma isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and cxcr4. *PLoS One*. 2007;2:e1110
126. Rueda P, Balabanian K, Lagane B, Staropoli I, Chow K, Levoye A, Laguri C, Sadir R, Delaunay T, Izquierdo E, Pablos JL, Lendinez E, Caruz A, Franco D, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F. The cxcl12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One*. 2008;3:e2543
127. Franco D, Rueda P, Lendinez E, Arenzana-Seisdedos F, Caruz A. Developmental expression profile of the cxcl12gamma isoform: Insights into its tissue-specific role. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009;292:891-901
128. Petit I, Jin D, Rafii S. The sdf-1-cxcr4 signaling pathway: A molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*. 2007;28:299-307
129. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: Next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2004;109:2454-2461
130. Capoccia BJ, Shepherd RM, Link DC. G-csf and amd3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism. *Blood*. 2006;108:2438-2445
131. Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, Laurendeau I, Galy-Fauroux I, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with sdf-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:644-650

132. Toth PT, Ren D, Miller RJ. Regulation of cxcr4 receptor dimerization by the chemokine sdf-1alpha and the hiv-1 coat protein gp120: A fluorescence resonance energy transfer (fret) study. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:8-17
133. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of cxcr4 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768:952-963
134. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for sdf-1 and i-tac involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006;203:2201-2213
135. Levoe A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. Cxcr7 heterodimerizes with cxcr4 and regulates cxcl12-mediated g protein signaling. *Blood.* 2009;113:6085-6093
136. Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, Nagler A, Lapidot T, Thelen M, Alon R. A crosstalk between intracellular cxcr7 and cxcr4 involved in rapid cxcl12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human t lymphocytes and cd34+ cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84:1130-1140
137. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, Parente E, Mancina R, Netti GS, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Gesualdo L, Rotondi M, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Essential but differential role for cxcr4 and cxcr7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med.* 2008;205:479-490
138. Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. Amd3100 is a cxcr7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol.* 2009;75:1240-1247
139. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, Lere-Dean C, Contreres JO, Sulpice E, Levy BI, Plouet J, Tobelem G, Le Ricousse-Roussanne S. Psgl-1-mediated activation of ephb4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2007;117:1527-1537
140. Oh IY, Yoon CH, Hur J, Kim JH, Kim TY, Lee CS, Park KW, Chae IH, Oh BH, Park YB, Kim HS. Involvement of e-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood.* 2007;110:3891-3899
141. Yoon CH, Hur J, Oh IY, Park KW, Kim TY, Shin JH, Kim JH, Lee CS, Chung JK, Park YB, Kim HS. Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1066-1072

142. Wu Y, Ip JE, Huang J, Zhang L, Matsushita K, Liew CC, Pratt RE, Dzau VJ. Essential role of icam-1/cd18 in mediating epc recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res*. 2006;99:315-322
143. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*. 2005;201:63-72
144. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. Pecam-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2514-2523
145. Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, de la Pompa JL, Elia A, Wakeham A, Karan-Tamir B, Muller WA, Senaldi G, Zukowski MM, Mak TW. Genetic evidence for functional redundancy of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (pecam-1): Cd31-deficient mice reveal pcam-1-dependent and pcam-1-independent functions. *J Immunol*. 1999;162:3022-3030
146. Farooq MM, Serra A, Newman PJ, Cambria RA, Seabrook GR, Towne JB, Freischlag JA. Pecam-1/igg attenuates peroxynitrite-mediated extremity reperfusion injury. *J Vasc Surg*. 2001;34:555-558
147. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-293
148. Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, Schroeder DA, Olson SB, Wong MH, Fleming WH. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*. 2004;103:13-19
149. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001;104:1046-1052
150. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004;94:230-238
151. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: Lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:411-421
152. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T, Brinkmann E, Fischer P, Meyer GP, Ganser A, Drexler H, Wollert KC. Bone marrow cells are a rich source of

- growth factors and cytokines: Implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29:2851-2858
153. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 1997;80:829-837
 154. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: Mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res*. 2004;95:354-363
 155. Cho HJ, Lee N, Lee JY, Choi YJ, Li M, Wecker A, Jeong JO, Curry C, Qin G, Yoon YS. Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. *J Exp Med*. 2007;204:3257-3269
 156. Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell*. 2011;8:389-398
 157. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427-435
 158. Walter DH, Krankenberg H, Balzer JO, Kalka C, Baumgartner I, Schluter M, Tonn T, Seeger F, Dimmeler S, Lindhoff-Last E, Zeiher AM. Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: A randomized-start, placebo-controlled pilot trial (provasa). *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4:26-37
 159. Idei N, Soga J, Hata T, Fujii Y, Fujimura N, Mikami S, Maruhashi T, Nishioka K, Hidaka T, Kihara Y, Chowdhury M, Noma K, Taguchi A, Chayama K, Sueda T, Higashi Y. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: A comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and buerger disease. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4:15-25
 160. Schiavetta A, Maione C, Botti C, Marino G, Lillo S, Garrone A, Lanza L, Pagliari S, Silvestroni A, Signoriello G, Sica V, Cobellis G. A phase ii trial of autologous transplantation of bone marrow stem cells for critical limb ischemia: Results of the naples and pietra ligure evaluation of stem cells study. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:572-578
 161. Cobellis G, Silvestroni A, Lillo S, Sica G, Botti C, Maione C, Schiavone V, Rocco S, Brando G, Sica V. Long-term effects of repeated autologous

- transplantation of bone marrow cells in patients affected by peripheral arterial disease. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42:667-672
162. Sugihara S, Yamamoto Y, Matsubara K, Ishida K, Matsuura T, Ando F, Igawa G, Narazaki G, Miake J, Tajima F, Nishio R, Nakayama B, Igawa O, Shigemasa C, Hisatome I. Autoperipheral blood mononuclear cell transplantation improved giant ulcers due to chronic arteriosclerosis obliterans. *Heart Vessels*. 2006;21:258-262
 163. Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, Takeshita S. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation*. 2006;114:2679-2684
 164. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-4295
 165. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 2005;85:962-971
 166. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2:477-488
 167. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109:235-242
 168. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25:1384-1392
 169. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-663
 170. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res*. 2005;66:543-551
 171. Smadja DM, d'Audigier C, Guerin CL, Mauge L, Dizier B, Silvestre JS, Dal Cortivo L, Gaussem P, Emmerich J. Angiogenic potential of bm mscs derived

- from patients with critical leg ischemia. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:997-1000
172. Kim SW, Han H, Chae GT, Lee SH, Bo S, Yoon JH, Lee YS, Lee KS, Park HK, Kang KS. Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells.* 2006;24:1620-1626
 173. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B, Chen S. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92:26-36
 174. Das AK, Bin Abdullah BJ, Dhillon SS, Vijanari A, Anoop CH, Gupta PK. Intra-arterial allogeneic mesenchymal stem cells for critical limb ischemia are safe and efficacious: Report of a phase i study. *World J Surg.* 2013;37:915-922
 175. Lee HC, An SG, Lee HW, Park JS, Cha KS, Hong TJ, Park JH, Lee SY, Kim SP, Kim YD, Chung SW, Bae YC, Shin YB, Kim JI, Jung JS. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: A pilot study. *Circ J.* 2012;76:1750-1760
 176. Teraa M, Sprengers RW, Westerweel PE, Gremmels H, Goumans MJ, Teerlink T, Moll FL, Verhaar MC. Bone marrow alterations and lower endothelial progenitor cell numbers in critical limb ischemia patients. *PLoS One.* 2013;8:e55592
 177. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. Intramuscular transplantation of g-csf-mobilized cd34(+) cells in patients with critical limb ischemia: A phase i/ii, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells.* 2009;27:2857-2864
 178. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004;109:1615-1622
 179. Li TS, Hamano K, Suzuki K, Ito H, Zempo N, Matsuzaki M. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H468-473
 180. Mees B, Recalde A, Loinard C, Tempel D, Godinho M, Vilar J, van Haperen R, Levy B, de Crom R, Silvestre JS. Endothelial nitric oxide synthase overexpression restores the efficiency of bone marrow mononuclear cell-based therapy. *Am J Pathol.* 2011;178:55-60

181. Smadja DM, Bieche I, Helley D, Laurendeau I, Simonin G, Muller L, Aiach M, Gaussem P. Increased vegfr2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *J Cell Mol Med*. 2007;11:1149-1161
182. Xu Q, Seeger FH, Castillo J, Iekushi K, Boon RA, Farcas R, Manavski Y, Li YG, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Micro-rna-34a contributes to the impaired function of bone marrow-derived mononuclear cells from patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:2107-2117
183. Zhu S, Deng S, Ma Q, Zhang T, Jia C, Zhuo D, Yang F, Wei J, Wang L, Dykxhoorn DM, Hare JM, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. MicroRNA-10a* and microRNA-21 modulate endothelial progenitor cell senescence via suppressing high-mobility group a2. *Circ Res*. 2013;112:152-164
184. Schwarz TM, Leicht SF, Radic T, Rodriguez-Araboalaza I, Hermann PC, Berger F, Saif J, Bocker W, Ellwart JW, Aicher A, Heeschen C. Vascular incorporation of endothelial colony-forming cells is essential for functional recovery of murine ischemic tissue following cell therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:e13-21
185. Chaudurge A, Wilhelm C, Chen-Tournoux A, Farahmand P, Bellamy V, Autret G, Menager C, Hagege A, Larghero J, Gazeau F, Clement O, Menasche P. Can magnetic targeting of magnetically labeled circulating cells optimize intramyocardial cell retention? *Cell Transplant*. 2012;21:679-691
186. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872
187. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell*. 2012;10:678-684
188. Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1100-1103
189. Rufaihah AJ, Huang NF, Jame S, Lee JC, Nguyen HN, Byers B, De A, Okogbaa J, Rollins M, Reijo-Pera R, Gambhir SS, Cooke JP. Endothelial cells derived from human ipscs increase capillary density and improve perfusion in a mouse model of peripheral arterial disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:e72-79
190. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147

191. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 2000;408:92-96
192. Cho SW, Moon SH, Lee SH, Kang SW, Kim J, Lim JM, Kim HS, Kim BS, Chung HM. Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 2007;116:2409-2419
193. Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One*. 2008;3:e1666
194. Blin G, Nury D, Stefanovic S, Neri T, Guillevic O, Brinon B, Bellamy V, Rucker-Martin C, Barbry P, Bel A, Bruneval P, Cowan C, Pouly J, Mitalipov S, Gouadon E, Binder P, Hagege A, Desnos M, Renaud JF, Menasche P, Puceat M. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest*. 2010;120:1125-1139
195. Lai WH, Ho JC, Chan YC, Ng JH, Au KW, Wong LY, Siu CW, Tse HF. Attenuation of hind-limb ischemia in mice with endothelial-like cells derived from different sources of human stem cells. *PLoS One*. 2013;8:e57876
196. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired b-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in *cxc4*- and *sdf-1*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9448-9453
197. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of b-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the *cxc* chemokine *pbsf/sdf-1*. *Nature*. 1996;382:635-638
198. Yan X, Cai S, Xiong X, Sun W, Dai X, Chen S, Ye Q, Song Z, Jiang Q, Xu Z. Chemokine receptor *cxc7* mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J Cell Biochem*. 2012;113:1437-1446
199. Dai X, Tan Y, Cai S, Xiong X, Wang L, Ye Q, Yan X, Ma K, Cai L. The role of *cxc7* on the adhesion, proliferation and angiogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15:1299-1309
200. Lee MJ, Kim J, Lee KI, Shin JM, Chae JI, Chung HM. Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy*. 2011;13:165-178

201. Moon SH, Kim JS, Park SJ, Lee HJ, Do JT, Chung HM. A system for treating ischemic disease using human embryonic stem cell-derived endothelial cells without direct incorporation. *Biomaterials*. 2011;32:6445-6455
202. Fleissner F, Jazbutyte V, Fiedler J, Gupta SK, Yin X, Xu Q, Galuppo P, Kneitz S, Mayr M, Ertl G, Bauersachs J, Thum T. Short communication: Asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism. *Circ Res*. 2010;107:138-143
203. Treguer K, Heinrich EM, Ohtani K, Bonauer A, Dimmeler S. Role of the microRNA-17-92 cluster in the endothelial differentiation of stem cells. *J Vasc Res*. 2012;49:447-460
204. Kudo FA, Nishibe T, Nishibe M, Yasuda K. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (cd34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int Angiol*. 2003;22:344-348
205. Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y, Han ZC. Randomised comparison of g-csf-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Haemost*. 2007;98:1335-1342
206. Canizo MC, Lozano F, Gonzalez-Porras JR, Barros M, Lopez-Holgado N, Briz E, Sanchez-Guijo FM. Peripheral endothelial progenitor cells (cd133 +) for therapeutic vasculogenesis in a patient with critical limb ischemia. One year follow-up. *Cytotherapy*. 2007;9:99-102
207. Burt RK, Testori A, Oyama Y, Rodriguez HE, Yaung K, Villa M, Bucha JM, Milanetti F, Sheehan J, Rajamannan N, Pearce WH. Autologous peripheral blood cd133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:111-116
208. Busik JV, Tikhonenko M, Bhatwadekar A, Opreanu M, Yakubova N, Caballero S, Player D, Nakagawa T, Afzal A, Kielczewski J, Sochacki A, Hasty S, Li Calzi S, Kim S, Duclas SK, Segal MS, Guberski DL, Esselman WJ, Boulton ME, Grant MB. Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock. *J Exp Med*. 2009;206:2897-2906
209. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase activity inactivates the cxc chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001;276:43503-43508
210. Segers VF, Revin V, Wu W, Qiu H, Yan Z, Lee RT, Sandrasagra A. Protease-resistant stromal cell-derived factor-1 for the treatment of experimental peripheral artery disease. *Circulation*. 2011;123:1306-1315

211. Staudacher DL, Sela Y, Itskovitz-Eldor J, Flugelman MY. Intra-arterial injection of human embryonic stem cells in athymic rat hind limb ischemia model leads to arteriogenesis. *Cardiovasc Revasc Med*. 2011;12:228-234

ANNEXES

Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization

Clément Cochain^{1†}, Mathieu P. Rodero^{2†}, José Vilar¹, Alice Récalde¹, Adèle L. Richart¹, Céline Loinard¹, Yasmine Zouggar¹, Coralie Guérin¹, Micheline Duriez¹, Behazine Combadière², Lucie Poupel², Bernard I. Lévy¹, Ziad Mallat^{1,3}, Christophe Combadière², and Jean-Sébastien Silvestre^{1*}

¹INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center—PARCC, Université Paris Descartes, UMR-S970 Paris, France; ²Laboratoire d'Immunologie et Infection, INSERM UMR-S945, Université Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, Paris, France; and ³University of Cambridge, Department of Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, Cambridge, United Kingdom

Received 12 March 2010; revised 18 May 2010; accepted 21 May 2010; online publish-ahead-of-print 25 May 2010

Time for primary review: 26 days

Aims	Monocyte systemic levels are known to be a major determinant of ischaemic tissue revascularization, but the mechanisms mediating mobilization of different monocyte subsets—Ly6C ^{hi} and Ly6C ^{lo} —to the blood and their respective role in post-ischaemic neovascularization are not clearly understood. Here, we hypothesized that distinct chemokine/chemokine receptor pathways, namely CCL2/CCR2, CX3CL1/CX3CR1, and CCL5/CCR5, differentially control monocyte subset systemic levels, and might thus impact post-ischaemic vessel growth.
Methods and results	In a model of murine hindlimb ischaemia, both Ly6C ^{hi} and Ly6C ^{lo} monocyte circulating levels were increased after femoral artery ligation. CCL2/CCR2 activation enhanced blood Ly6C ^{hi} and Ly6C ^{lo} monocyte counts, although the opposite effect was seen in mice with CCL2 or CCR2 deficiency. CX3CL1/CX3CR1 strongly impacted Ly6C ^{lo} monocyte levels, whereas CCL5/CCR5 had no role. Only CCL2/CCR2 signalling influenced neovascularization, which was increased in mice overexpressing CCL2, whereas it markedly decreased in CCL2 ^{−/−} mice. Moreover, adoptive transfer of Ly6C ^{hi} —but not Ly6C ^{lo} —monocytes enhanced vessel growth and blood flow recovery.
Conclusion	Altogether, our data demonstrate that regulation of proangiogenic Ly6C ^{hi} monocytes systemic levels by CCL2/CCR2 controls post-ischaemic vessel growth, whereas Ly6C ^{lo} monocytes have no major role in this setting.
Keywords	Ischaemia • Angiogenesis • Arteriogenesis • Inflammation • Monocyte subset

1. Introduction

Arteriogenesis and angiogenesis are critical processes involved in the response of the organism to ischaemic injury, and contribute to tissue revascularization and organ preservation.¹ Infiltration of inflammatory cells in hypoxic areas is a hallmark of tissue ischaemia, and the respective role of distinct leucocyte subsets in post-ischaemic neovascularization—CD4⁺ and CD8⁺ T cells,^{2,3} NK cells,⁴ regulatory T cells,⁵ mast cells⁶—has been unravelled. Monocytes have also been shown to promote arteriogenesis and angiogenesis by releasing angiogenic growth factors, cytokines, and metalloproteinases.^{7,8}

Mouse monocytes comprise at least two phenotypically distinct subsets: Ly6C^{hi} 7/4^{hi}CCR2⁺CX3CR1^{lo} and Ly6C^{lo} 7/4^{lo}CCR2[−]CX3CR1^{hi} monocytes. The human counterparts are CD14^{hi}CD16[−] and CD14^{lo}CD16⁺ monocytes, respectively.⁹ 'Inflammatory' Ly6C^{hi} monocytes rapidly enter sites of inflammation, whereas 'Resident' Ly6C^{lo} monocytes enter lymphoid and non-lymphoid organs under homeostatic conditions,¹⁰ and patrol across the vascular endothelium in a CX3CR1-dependent manner.¹¹ The specific role of each monocyte subset in post-ischaemic neovascularization remains unclear: Nahrendorf *et al.*¹² proposed a proangiogenic activity for Ly6C^{lo} monocytes, based on their high secretion of vascular endothelial

[†] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: Paris Cardiovascular Research Center, INSERM U970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Paris Descartes, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France. Tel: +33 153988060; fax: +33 153987951, Email: jean-sebastien.silvestre@inserm.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.

growth factor (VEGF) in the ischaemic myocardium. Accumulation of CX3CR1-expressing cells also exacerbates retinal neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration, presumably through VEGF expression.¹³ Additionally, a population of Tie2-expressing monocytes, belonging to the Ly6C^{lo} subset, has been shown to promote tumour angiogenesis.¹⁴ In contrast, Capoccia *et al.*¹⁵ demonstrated that adoptive transfer of bone marrow (BM)-derived Ly6C^{hi} monocytes in mice with unilateral limb ischaemia improved blood flow recovery, whereas adoptive transfer of Ly6C^{lo} monocytes did not. Thus, specific involvement of each monocyte subset in post-ischaemic neovascularization requires further investigation.

Monocyte recruitment to ischaemic areas is thought to occur mainly via chemokine/chemokine receptor signalling. In ischaemic hindlimb models deficiency in CCL2 or its receptor, CCR2, reduces post-ischaemic inflammation and vessel growth.^{16,17} Of interest, lack of CCR2 specifically abrogates Ly6C^{hi} monocyte infiltration in the ischaemic myocardium.^{12,18} However, other chemoattractant pathways might be involved: CX3CL1/CX3CR1 and CCL5/CCR5 promote Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} monocyte infiltration into atherosclerotic plaques, respectively,¹⁹ and CX3CR1 governs Ly6C^{lo} monocyte infiltration into the ischaemic myocardium.¹²

In addition to the well-established role of CCL2/CCR2 signalling in monocytes recruitment to inflamed tissues, recent reports also highlighted its involvement in monocytes mobilization from the BM.^{20–22} Interestingly, in two models of bacterial infection, CCR2 was involved in monocytes mobilization from the BM, but not in their recruitment towards inflamed tissues.^{22,23} Moreover, CX3CR1 and CCR5 have been shown to control blood monocyto-sis in high fat diet fed hyperlipidemic mice.²⁰ As post-ischaemic neovascularization is highly dependent on monocytes levels in the bloodstream,²⁴ one can speculate that CCL2/CCR2, CX3CL1/CX3CR1, and CCL5/CCR5 might mainly control the circulating number of monocyte subset.

Here, we studied the role of CCL2/CCR2, CX3CL1/CX3CR1, and CCL5/CCR5 in the regulation of Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} monocytes systemic levels and their subsequent roles in post-ischaemic neovascularization. We demonstrate that CCL2/CCR2 controls circulating levels of both monocyte subset, whereas CX3CL1/CX3CR1 preferentially impacts Ly6C^{lo} monocytes. We also show that CCL2/CCR2 signalling is required for adequate neovascularization, and that adoptive transfer of Ly6C^{hi}—but not Ly6C^{lo}—monocytes promotes functional blood flow recovery in ischaemic hindlimbs.

2. Methods

2.1 Animals

Ten-week-old males C57BL/6 (Charles River), CCL2^{−/−} (from Barrett Rollins, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA), CCR2^{−/−}, CX3CR1^{−/−}, CR5^{−/−} mice and mice expressing GFP under the CX3CR1 promoter (CX3CR1^{gfp/+}) (from Jackson Laboratories) were used.

The investigation conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

All the experiments were performed in accordance with the European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (No. 07430).

2.2 Hindlimb ischaemia model and plasmid electrotransfer

Mice underwent right femoral artery ligation under isoflurane anaesthesia. Right femoral artery was permanently ligated. Six hours after femoral artery ligation, 50 µg of plasmids encoding an irrelevant Ig, CCL2, CX3CL1, or CCL5 were injected into both tibial anterior and gastrocnemius muscles of the anesthetized mouse. Then, transcutaneous electric pulses (8 square-wave electric pulses of 200 V/cm, 20 ms each, at 2 Hz) were delivered by a PS-15 electropulsator (Jouan) with two stainless steel plate electrodes placed 4.2–5.3 mm apart, at each side of the leg. The left leg was not ligated or electrotransferred and was used as an internal control.

2.3 Analysis of neovascularization

2.3.1 Microangiography

Mice were anesthetized (pentobarbital), and longitudinal laparotomy was performed to introduce a polyethylene catheter into the abdominal aorta and inject contrast medium (barium sulfate, 1 g/mL). Angiography of hindlimbs was then performed, and images (2 per animal) were acquired with the use of a high-definition digital X-ray transducer. Images were assembled to obtain a complete view of the hindlimbs. The number of pixels occupied by vessels was measured in the quantification area with the use of Primedangio software (Trophy System, Paris, France). Area of quantification was limited by placement of the ligature on the femoral artery, the knee, the edge of the femur, and the external limit of the leg. The results were then expressed as a ratio of ischaemic to non-ischaemic leg.

2.3.2 Capillary density analysis

Sections (7 µm) of gastrocnemius muscles were stained using FITC-conjugated *Bandeirea simplicifolia* Isolectin B4. Capillaries were counted in five randomly chosen fields of a definite area with the use of Image J (NIH) software. Analyses were performed in a blinded manner by two independent investigators. The capillary density was determined in both ischaemic and non-ischaemic legs. Results were expressed as ischaemic to non-ischaemic ratio.

2.3.3 Laser Doppler perfusion imaging

Briefly, excess hairs were removed by depilatory cream from the limb and mice were placed on a heating plate at 37°C to minimize temperature variation. Foot perfusion was measured using a Moor LDI. Perfusion is expressed as a ratio of ischaemic to non-ischaemic foot paw.

2.4 Flow cytometry analysis

Ischaemic gastrocnemius and tibialis anterior muscles were weighed, minced, and digested in 450 U/mL Collagenase I, 125 U/mL Collagenase XI, 60 U/mL DNaseI, and 60 U/mL hyaluronidase (Sigma Aldrich) for 1 h at 37°C. Cells were also isolated from femur, venous blood, and spleen. All cell suspensions were layered on Histopaque 1083 (Sigma Aldrich) for gradient density centrifugation. The mononuclear cell fraction was counted and stained using anti-mouse CD11b-PerCPy5.5, Ly6G-PE, NK1.1-PE (BD Biosciences), 7/4-FITC or 7/4-APC (Serotec), or the corresponding isotypes, and analysed on a LSRII Flow Cytometer (Becton Dickinson) with the FACS Diva software (Becton Dickinson). Cells being CD11b^{hi}Ly6G[−]NK1.1[−] were considered to be monocytes, and subsets discrimination was made upon 7/4 expression. 7/4 expression has been shown to be equivalent to Ly6C expression on monocyte subset.²⁰

2.5 RNA extraction and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Total RNA from tibialis anterior muscle was extracted with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Paris, France). RNA was extracted from sorted monocytes with RNeasy microkits

(Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Polymerase chain reaction was performed on an ABI Prizm 7700 with the use of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Mouse GAPDH was used to normalize sample amplification. The following oligonucleotides (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) served as primers: GAPDH forward: 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3', reverse: 5'-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3'; CCL2 forward: 5'-CCCCACTCACCT GCTGCT A-3', reverse: 5'-TTACGGG TCAACTTCACATTCAAA-3'; CCL5 forward: 5'-GCTGCCCTCACCAT CATCCTCACT 3', reverse: 5'-GGCACACACTTGGCGGTTCTTC-3'; CX3CL1 forward: 5'-GTGGCTTTGCTC ATCCGCTATCAG-3', reverse: 5'-CACATTGTCCACCCGCTTCTCA-3'. MMP9 Forward: 5'-TC

GGGAAGGCTCTGCTGTTCA-3', Reverse: 5'-GGAAACTCACACGCC AGAAGAATTG-3'.

2.6 Chemokine plasma levels

Plasma CCL2, CX3CL1, and CCL5 were measured using Quantikine Elisa Kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

2.7 Monocyte sorting and adoptive transfer experiments

For RT-PCR experiments, 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocytes were sorted from digested ischaemic muscles of blood and 3 days after femoral artery ligation, CX3CR1^{gfp/+} mice. For adoptive transfer experiments, spleens

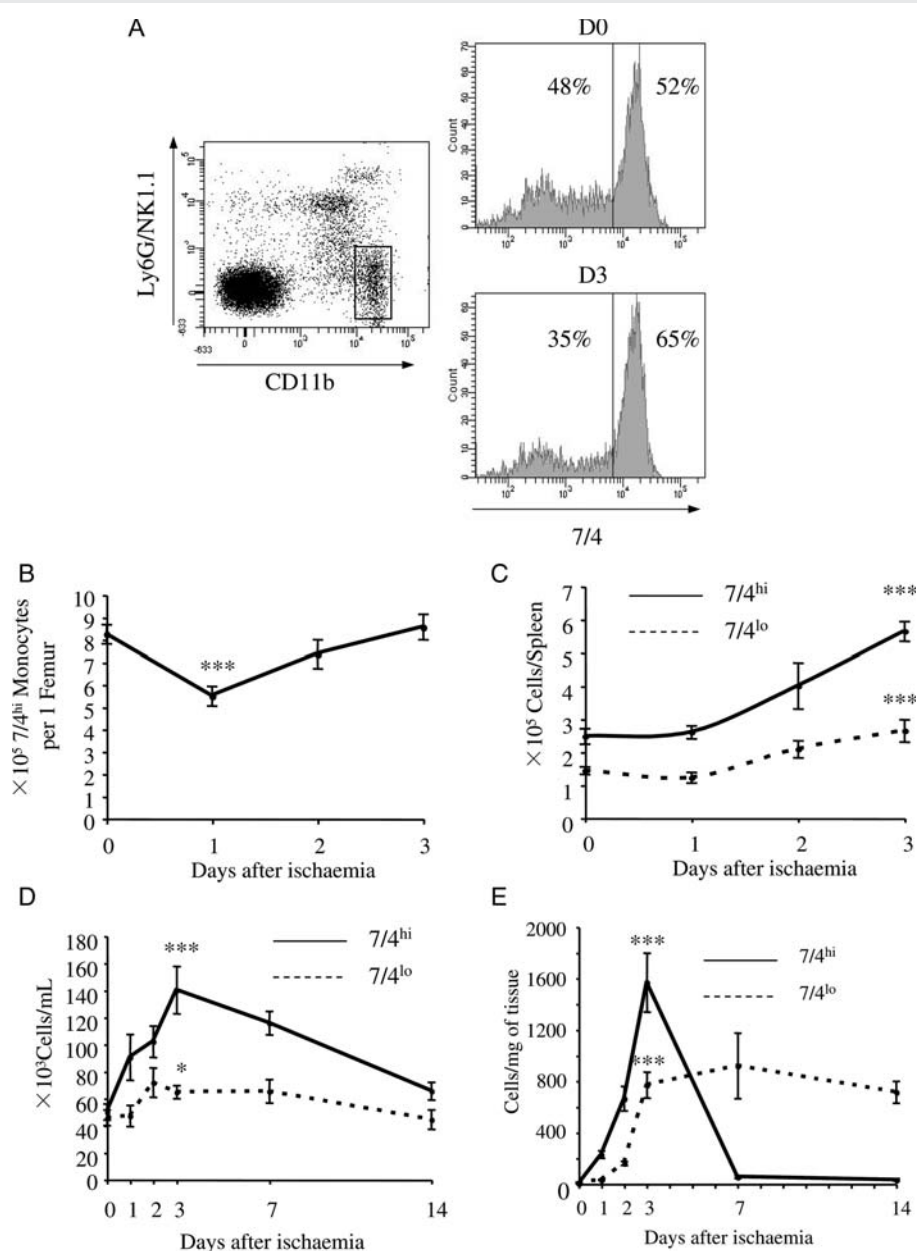


Figure 1 (A) Representative fluorescence activated cell sorting analysis of monocyte. Analysis of circulating leucocytes is shown. Left: representative gating of CD11b^{hi}Ly6G⁺NK1.1⁻ monocytes. Right: histograms showing 7/4 expression on gated cells at D0 and D3 after ischaemia. Monocyte counts in the (B) BM and (C) spleen at D0, D1, D2, and D3 after ischaemia. Counts of 7/4^{hi} (full line) and 7/4^{lo} (dotted line) monocytes in the (D) blood, and (E) ischaemic muscles at D0, D1, D2, D3, D7, and D14 after ischaemia. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs. D0; $n = 4-10$ /time point.

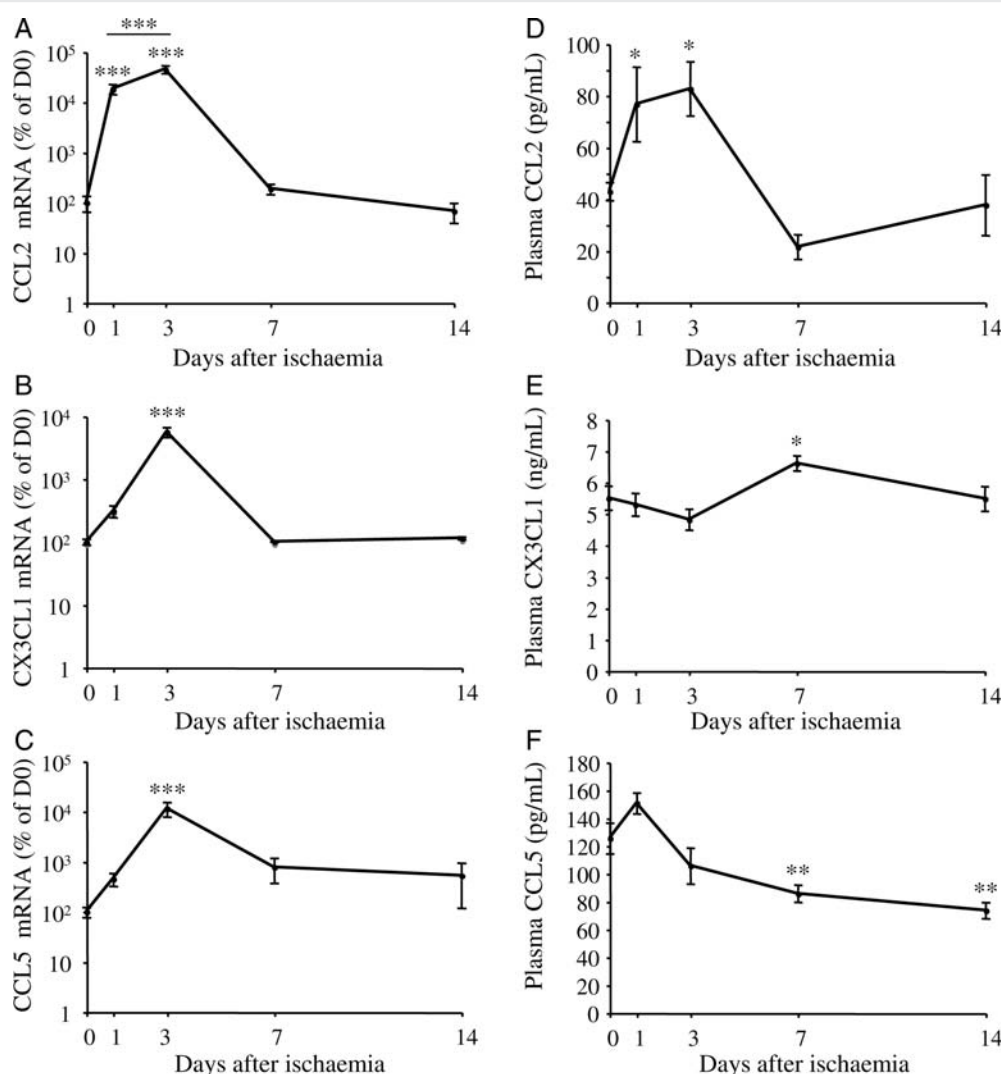


Figure 2 Left: mRNA levels of (A) CCL2, (B) CX3CL1, and (C) CCL5 in the ischaemic tibialis anterior muscle at 0, 1, 3, 7, and 14 days after induction of limb ischaemia, expressed as percentage of mRNA levels at D0. *** $P < 0.001$ vs. D0. Right: Plasma levels of (D) CCL2, (E) CX3CL1, and (F) CCL5 measured at 0, 1, 3, 7, and 14 days after ischaemia. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs. D0. $n = 4$ –10/time point.

from 8 weeks old C57BL/6 mice were mechanically dissociated on 40 μ m cell strainer. Ly6G⁺CD11b⁺ cells were magnetically selected with Ly6G and CD11b microbeads (Miltenyi), according to the manufacturers instructions, and stained with CD11b-PerCPy5.5, Ly6G-PE, NK1.1-PE, and 7/4-FITC. CD11b⁺Ly6G⁺NK1.1⁺ 7/4^{hi} and CD11b⁺Ly6G⁺NK1.1⁺ 7/4^{lo} were then selected using a FACS Aria (BD). Purity for both subset was >99%. Before injection, cells were counted by trypan blue exclusion. 10^5 7/4^{hi} monocytes or 10^5 7/4^{lo} monocytes were then intravenously injected to C57BL/6 recipients, 6 h after femoral artery ligation.

2.8 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. Kruskal–Wallis analysis of variance was used to compare each parameter. *Post hoc* Mann–Whitney *U* test with Bonferroni correction were then performed to identify which group differences account for the significant overall Kruskal–Wallis. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Ischaemia induces monocyte mobilization from the BM to the bloodstream and recruitment to ischaemic muscles

CD11b⁺Ly6G⁺NK1.1⁺ cells were considered to be monocytes (Figure 1A), and 7/4 expression levels were used to discriminate between monocyte subsets (Figure 1A).

In the BM, monocyte count decreased between D0 and D1, and returned to basal levels thereafter (Figure 1B). In a model of myocardial infarction, monocytes have been shown to be mobilized from the spleen.¹⁸ However, we did not observe any decrease in spleen monocyte content in our experimental conditions. In contrast, spleen 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocyte numbers remained stable between D0 and D1, and increased thereafter (Figure 1C).

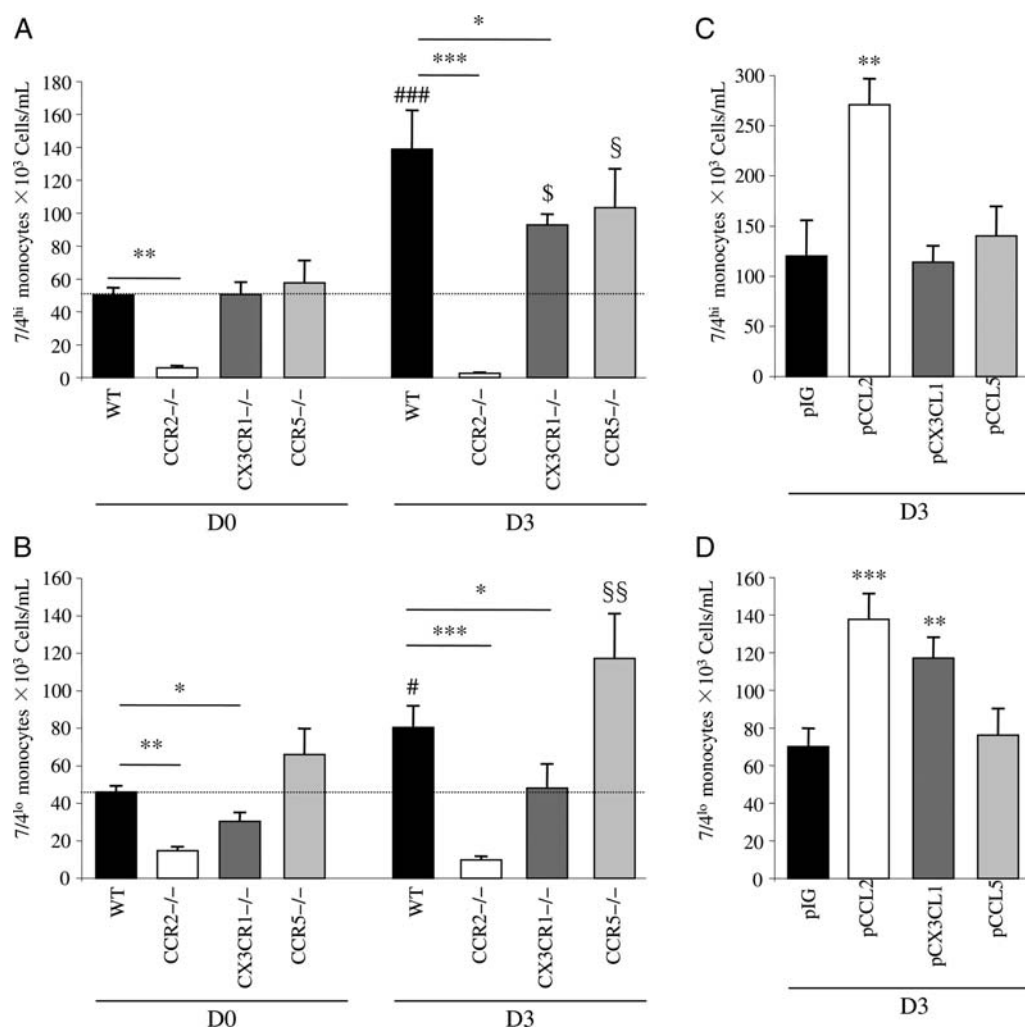


Figure 3 Circulating (A) 7/4^{hi} and (B) 7/4^{lo} monocytes in WT, CCR2^{-/-}, CX3CR1^{-/-}, and CCR5^{-/-} mice at D0 and D3. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; #*P* < 0.05; ###*P* < 0.001 vs. WT at D0; \$*P* < 0.05 vs. CX3CR1^{-/-} at D0; §*P* < 0.05; §§*P* < 0.001 vs. CCR5^{-/-} at D0. Circulating (C) 7/4^{hi} and (D) 7/4^{lo} monocytes in mice electrotransfected with a plasmid expressing an irrelevant IG (pIG), CCL2 (pCCL2), CX3CL1 (pCX3CL1), or CCL5 (pCCL5). ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 vs. pIG. In (A) and (B), dotted line represents the baseline levels in WT mice. *n* = 4–8 mice/group.

In the blood, 7/4^{hi} monocyte count raised between D0 and D1, peaked at D3 and returned to basal levels at D14. 7/4^{lo} monocyte levels were increased at D2 and D7 after the onset of ischaemia (Figure 1D).

In the ischaemic muscle, 7/4^{hi} monocytes were the main subset of infiltrating monocytes, and peaked at day 3 after ischaemia. 7/4^{lo} monocytes levels were upregulated at D3, and remained stable from D3 to D14 (Figure 1E).

3.2 Ischaemia upregulates CCL2, CX3CL1, and CCL5 mRNA and protein levels

CCL2 mRNA was upregulated as early as D1 after ischaemia and peaked at D3 (Figure 2A, *P* < 0.001). CX3CL1 and CCL5 mRNAs were raised at D3 (Figure 2B and C, *P* < 0.001). CCL2, CX3CL1, and CCL5 mRNAs contents returned to basal levels at D7 (Figure 2A, B, and C).

Plasma CCL2 was strongly increased by 74 and 92% at D1 and D3, respectively (*P* < 0.05 vs. D0), and returned to basal levels thereafter (Figure 2D). A significant (*P* < 0.05) increase in plasma CX3CL1 levels was observed at D7 after ischaemia, only (Figure 2E). Plasma CCL5 was slightly increased at D1 after ischaemia, but this did not reach statistical significance (*P* = 0.067). However, it significantly decreased at D7 and D14 (Figure 2F). Those results show that ischaemia markedly upregulates inflammatory chemokines expression and secretion.

3.3 Differential role of chemokine/chemokine receptor pathways in the control of circulating monocyte levels after ischaemia

In CCR2^{-/-} mice, circulating 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocyte levels were reduced when compared with wild-type mice (Figure 3A and B, *P* < 0.05 to *P* < 0.001), and were not upregulated after femoral artery ligation. Similar results were observed in CCL2^{-/-} mice

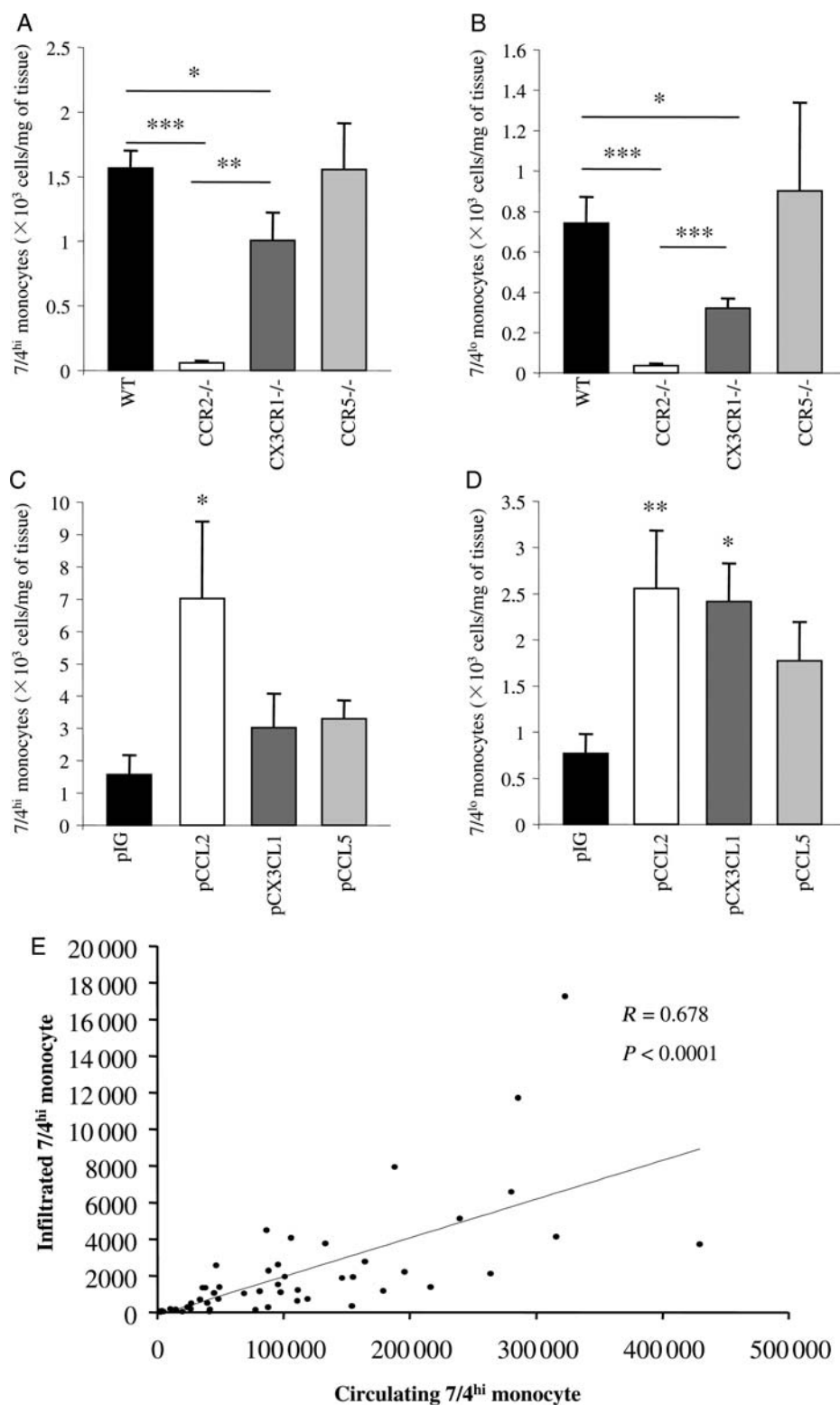


Figure 4 Infiltration of (A) 7/4^{hi} and (B) 7/4^{lo} monocytes in the ischaemic muscles of WT, CCR2^{-/-}, CX3CR1^{-/-}, and CCR5^{-/-} mice D3. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. Infiltration of (C) 7/4^{hi} and (D) 7/4^{lo} monocyte in the ischaemic muscles of mice electrotransferred with a plasmid expressing an irrelevant IG (pIG), CCL2 (pCCL2), CX3CL1 (pCX3CL1), or CCL5 (pCCL5) at D3 after ischaemia. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs. pIG. *n* = 4–8 mice/group. (E) Correlation between circulating and infiltrating 7/4^{hi} monocyte at D3. All genotypes (WT, CCR2^{-/-}, CCL2^{-/-}, CX3CR1^{-/-}, CCR5^{-/-}) and plasmid-treated groups (pIG, pCCL2, pCX3CL1, pCCL5) are represented, *R* = 0.678; *P* < 0.0001; *n* = 53.

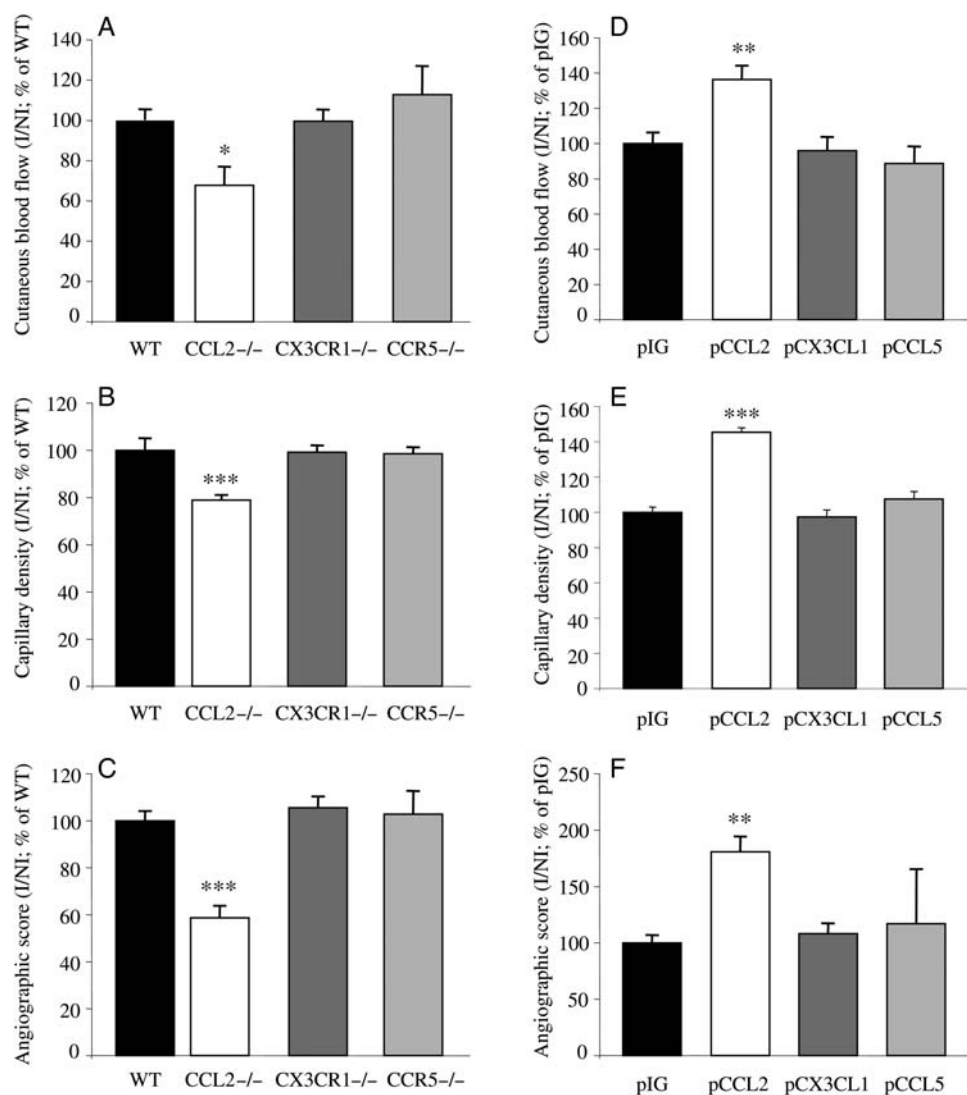


Figure 5 (A) Cutaneous blood flow, (B) capillary density, and (C) angiographic score in WT, CCL2^{-/-}, CX3CR1^{-/-}, and CCR5^{-/-} mice 21 days after ischaemia. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs. WT. (D) cutaneous blood flow, (E) capillary density, and (F) angiographic score in mice electrotransfected with a plasmid expressing an irrelevant IG (pIG), CCL2 (pCCL2), CX3CL1 (pCX3CL1), or CCL5 (pCCL5). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. pIG. $n = 4-10$ mice/group.

(data not shown). Interestingly, CX3CR1 deficiency mainly reduced 7/4^{lo} monocytes levels and hampered the ischaemia-induced 7/4^{lo} monocyte counts upregulation. CCR5 deficiency had no obvious effects. Those results are consistent with additional data showing that overexpression of CCL2 by plasmid electrotransfer markedly increased circulating 7/4^{hi} (Figure 3C, $P < 0.01$) and 7/4^{low} (Figure 3D, $P < 0.001$) monocyte counts at D3. In addition, CX3CL1 overexpression raised 7/4^{lo} monocytes, only (Figure 3D, $P < 0.01$), whereas CCL5 overexpression had no effect (Figure 3C and D).

3.4 Monocyte recruitment to ischaemic tissues depends on their circulating levels

7/4^{hi} (Figure 4A) and 7/4^{lo} (Figure 4B) monocyte infiltration was almost abolished in the ischaemic muscles of CCR2^{-/-} mice. 7/4^{lo} monocyte subset infiltration was reduced by 62%, and that of 7/4^{hi} by 35% only, in CX3CR1-deficient mice (Figure 4A and B). CCR5 deficiency did not alter monocyte numbers in ischaemic muscles (Figure 4A and B).

In line with these results, overexpression of CCL2 increased infiltration of 7/4^{hi} (Figure 4C, $P < 0.05$) and 7/4^{lo} (Figure 4D, $P < 0.01$) monocytes. CX3CL1 upregulation raised 7/4^{lo} monocytes only ($P < 0.05$). CCL5 plasmid had no significant effect. Taken together, our results showed that, CCL2/CCR2 signalling affected infiltration of both monocyte subset, whereas CX3CL1/CX3CR1 preferentially acted on the 7/4^{lo} population. Even though adoptively transferred CCR2^{-/-} monocytes had a reduced ability to infiltrate ischaemic tissues (data not shown), the rate of infiltrating monocytes was highly dependent on their circulating numbers (Figure 4E, $r = 0.678$; $P < 0.0001$).

3.5 CCL2/CCR2, but not CX3CL1/CX3CR1 or CCL5/CCR5, controls post-ischaemic neovascularization

Next, we sought to evaluate the impact of the three signalling pathways on post-ischaemic vessel growth. Twenty-one days after the onset of

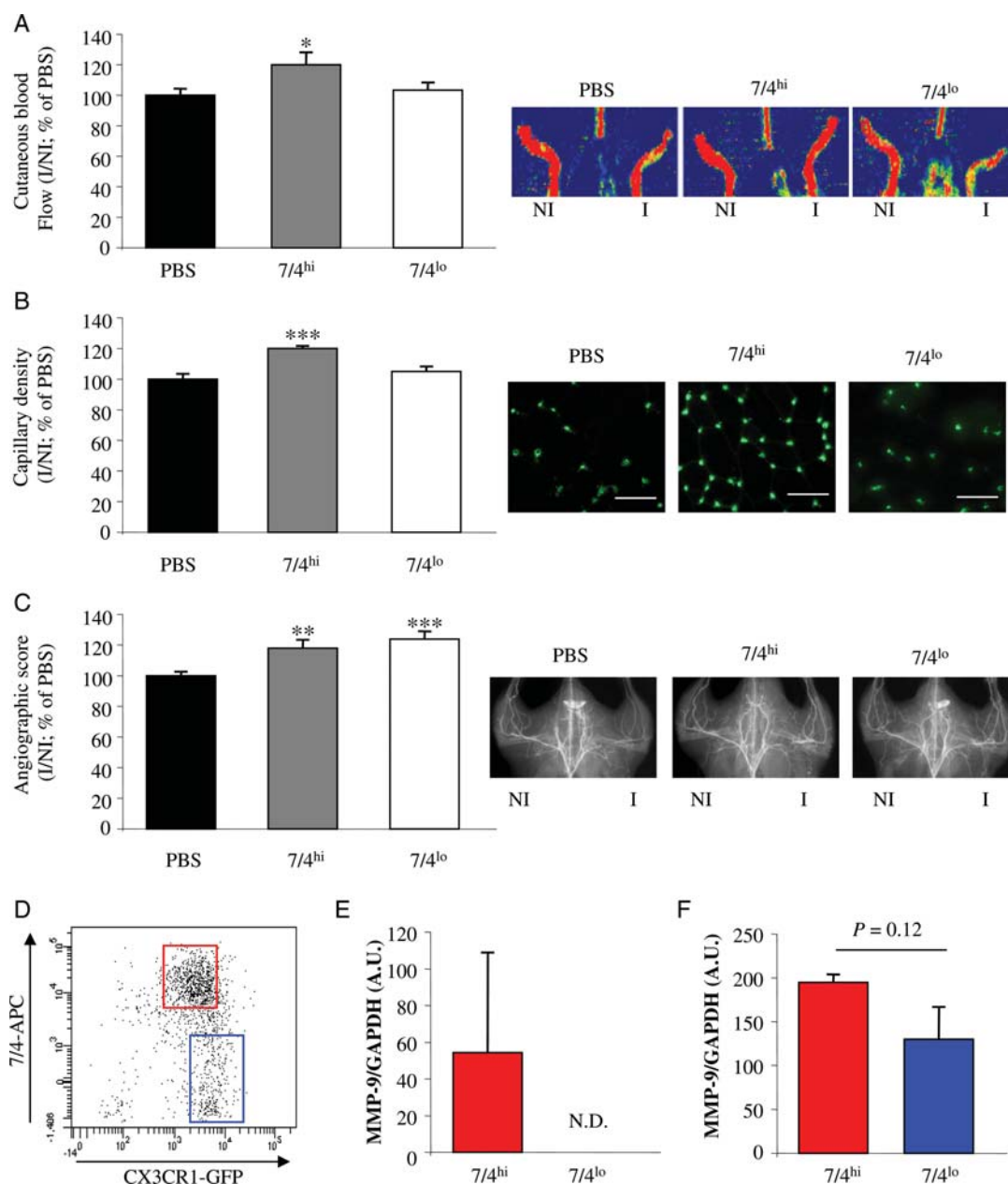


Figure 6 Left: quantitative evaluation and right: representative photomicrographs of (A) cutaneous blood flow, (B) capillary density (scale bar = 50 micrometers), and (C) angiographic score 14 days after ischaemia in animals intravenously injected with PBS, 10^5 7/4^{hi} monocytes or 10^5 7/4^{lo} monocyte. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. PBS injected mice. $n = 4-6$ mice/group. (D) Representative dot plot of gated CD11b⁺Ly6G⁻NK1.1⁻ monocytes obtained from digested ischaemic muscles of CX3CR1^{gfp/+} mice. Representative gating used for monocyte subset sorting is shown. (E) MMP-9 mRNA expression in sorted peripheral blood monocyte subset (A.U., arbitrary units; N.D., not detected). (F) MMP-9 mRNA expression in sorted infiltrating monocyte subset.

ischaemia, foot perfusion ($P < 0.01$), angiographic score ($P < 0.001$), and capillary density ($P < 0.001$) were reduced in CCL2^{-/-} mice. In contrast, post-ischaemic vessel growth was unchanged in CX3CR1^{-/-} and CCR5^{-/-} mice (Figure 5A and C). In this line, electrotransfer of CCL2 expressing plasmid increased foot perfusion ($P < 0.001$), angiographic score ($P < 0.001$), and capillary density ($P < 0.001$) when compared with control mice. Neither CX3CL1 nor CCL5 overexpression-induced significant effects (Figure 5D, E, and F). Altogether, these results show that CCL2/CCR2 signalling, but not CX3CL1/CX3CR1 or CCL5/CCR5, controls post-ischaemic neovascularization.

3.6 7/4^{hi} monocytes promote post-ischaemic neovascularization

Because 7/4^{lo} monocytes are scarce in the BM and difficult to collect in sufficient amounts from blood, we used splenic 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocytes as surrogates for circulating monocyte subset. In addition, a recent report has shown that blood and spleen monocyte subset are almost identical in transcriptome and function.¹⁸ Six hours after femoral artery ligation, mice received intravenous injection of PBS, 10^5 7/4^{hi} monocytes or 10^5 7/4^{lo} monocytes. 7/4^{hi} monocytes transfer

improved foot perfusion (Figure 6A, $P < 0.05$), capillary density (Figure 6B, $P < 0.001$), and angiographic score (Figure 6C, $P < 0.01$) compared with PBS-treated mice. In contrast, injection of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes only enhanced angiographic score by 25% (Figure 6C, $P < 0.001$ vs. PBS). To start to investigate the mechanism implicated in promotion of vessel growth by the two distinct populations, we analysed MMP-9 and VEGF-A levels. At 3 days after ischaemia, monocyte subset were sorted from peripheral blood and ischaemic muscles of mice expressing GFP under the CX3CR1 promoter (CX3CR1^{8fp/+} mice) (Figure 6D) and RT-PCR analysis was performed. MMP-9 mRNA was detected in circulating $7/4^{\text{hi}}$ GFP^{lo} but not in $7/4^{\text{lo}}$ GFP^{hi} monocytes. MMP-9 levels were increased by 1.5-fold in infiltrating $7/4^{\text{hi}}$ GFP^{lo} monocytes compared with $7/4^{\text{lo}}$ GFP^{hi} monocytes, although this did not reach statistical significance (Figure 6E, $P = 0.12$). In this line, MMP-9 levels were reduced in the ischaemic muscles of CCR2^{-/-} mice, at D3 (data not shown). VEGF expression did not differ between monocyte subset (data not shown).

4. Discussion

Our results emphasize the major role of CCL2/CCR2 signalling in the control of monocyte subset circulating levels and subsequently in ischaemia-induced neovascularization.

In mice with femoral artery ligation, circulating $7/4^{\text{hi}}$ monocyte levels were increased as early as day 1 after ischaemia. Similarly, blood monocytosis has been shown in patients with critical limb ischaemia.²⁵ In mice with myocardial infarction, mobilized monocytes originated from the spleen.¹⁸ However, splenic counts of each monocyte subset did not decrease after femoral artery ligation, suggesting that monocytes are not mobilized from the spleen in this setting. In contrast, we noted a significant decrease of BM $7/4^{\text{hi}}$ monocytes at day 1 suggesting that monocytes mobilized in the bloodstream following ischaemia originate from the BM.

CCL2/CCR2 controls monocytes recruitment to ischaemic tissues.^{12,15–17} However, we demonstrate here that this signalling pathway is mainly involved in the regulation of their circulating levels following ischaemia. Blood monocytes number is a critical determinant of post-ischaemic vessel growth.²⁴ Our results clearly show that disruption of the CCL2/CCR2 pathway leads to a drastic reduction of monocytes mobilization to the bloodstream and hampers post-ischaemic vessel growth. Similarly, overexpression of CCL2 strongly increased both $7/4^{\text{hi}}$ and $7/4^{\text{lo}}$ monocytes circulating numbers and activated neovascularization. Altogether, our results suggest that, even though recruitment of adoptively transferred monocytes was dampened by CCR2 deficiency, infiltration of $7/4^{\text{hi}}$ monocytes into ischaemic tissues was mainly dependent on their circulating levels.

We also evidenced a role of CX3CL1/CX3CR1, but not of CCL5/CCR5, in the control of monocytes circulating numbers. Monocytes are short-lived cells, and CX3CR1 signalling has been shown to promote their survival:²⁶ endogenous CX3CR1 signalling might be required for the survival of newly mobilized BM-originating monocytes. This is supported by our observation of a lower number of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes in CX3CR1^{-/-} mice. CCL5/CCR5 is involved in the regulation of monocyte circulating counts in high fat diet fed ApoE^{-/-} mice,²⁰ which represent a context of chronic inflammation. In the early phase of limb ischaemia, which might be considered as a context of acute inflammation, we were unable to evidence a clear role of CCL5/CCR5 in the regulation of circulating or infiltrating monocytes. Similarly, treatment with the CCR5

antagonist Met-Rantes only affects monocyte number in hypercholesterolemic and chronically inflamed ApoE^{-/-} mice, but not in ApoE^{+/+} controls.²⁰

Following the increase of their levels in the bloodstream, both subsets of monocytes, $7/4^{\text{hi}}$ (Ly6C^{hi}) and $7/4^{\text{lo}}$ (Ly6C^{lo}), were recruited to ischaemic muscles. Inflammatory $7/4^{\text{hi}}$ monocytes were preponderant at early time points, whereas only $7/4^{\text{lo}}$ monocytes were present after day 7 onward, as previously reported.¹² Variations in monocytes levels were associated with changes in the chemokines expression pattern: CCL2 was increased at day 1 in the ischaemic tissues and blood, whereas CX3CL1 was upregulated at day 3 and 7, only.

The proangiogenic potential of the distinct monocyte subset in the context of tissue ischaemia has been unclear so far.^{12,15} In this study, we highlighted a major role of $7/4^{\text{hi}}$ monocytes in post-ischaemic vessel growth. Indeed, abrogation of ischaemia-induced $7/4^{\text{hi}}$ monocyte infiltration in CCL2^{-/-} mice fully inhibited post-ischaemic vessel growth. In contrast, a drastic reduction of infiltrating $7/4^{\text{lo}}$ monocytes number associated with CX3CR1 deficiency did not hamper arteriogenesis or angiogenesis. Similarly, intravenous administration of $7/4^{\text{hi}}$ (Ly6C^{hi}) enhanced arteriogenesis and angiogenesis, leading to functional blood flow recovery, whereas that of $7/4^{\text{lo}}$ (Ly6C^{lo}) monocytes only promoted arteriogenesis and did not affect tissue perfusion. This distinct proangiogenic potential might result from the differential expression of angiogenic factors. Sorted $7/4^{\text{hi}}$ monocytes expressed more MMP-9 than $7/4^{\text{lo}}$ monocytes, which is consistent with their high proteolytic activity observed in a model of myocardial infarction.¹² The role of MMP-9 in angiogenesis has been well documented: MMP-9 has a crucial role in newly formed capillaries branching after tissue ischaemia.⁸ MMP-9 also triggers the angiogenic switch in tumours through release of extracellular matrix bound VEGF,²⁷ and myeloid cells-induced tumour angiogenesis is dependent on MMP-9.²⁸

Interestingly, activation or disruption of CCL2/CCR2 signalling impacted circulating and infiltrating levels of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes, which barely express CCR2: $7/4^{\text{hi}}$ monocytes might trigger the secondary recruitment of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes. $7/4^{\text{hi}}$ monocytes might also switch to a $7/4^{\text{lo}}$ phenotype, as proposed previously.²⁹

In conclusion, we showed that ischaemia induces the mobilization of proangiogenic and proarteriogenic monocytes to the bloodstream through CCL2/CCR2, with an accessory role of CX3CL1/CX3CR1. This chemokine-dependent regulation of monocyte systemic levels dictates the amplitude of their recruitment into ischaemic tissues, where they promote revascularization and functional recovery of blood flow.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by grants from Inserm, ANR «Cardiovasculaire, obésité et diabète» (AO5088DS), ANR 2008 «Neurologiques et Maladies Psychiatriques», European Grant Innochem 518167 European community (ENDOSTEM No. 241440) and Assistance Public-Hôpitaux de Paris/Institut Pasteur. M.P.R. is supported by European Grant Innochem 518167 and L.P. by Assistance Public-Hôpitaux de Paris.

References

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;**9**:653–660.
2. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4–knockout mice. *Circulation* 2003;**108**:205–210.
3. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U et al. CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of

- collateral vessel development and recruiting CD4⁺ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* 2006;**113**:118–124.
4. van Weel V, Toes RE, Seghers L, Deckers MM, de Vries MR, Eilers PH et al. Natural killer cells and CD4⁺ T-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:2310–2318.
 5. Zouggari Y, Ait-Oufella H, Waeckel L, Vilar J, Loinard C, Cochain C et al. Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation* 2009;**120**:1415–1425.
 6. Heissig B, Rafii S, Akiyama H, Ohki Y, Sato Y, Rafael T et al. Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *J Exp Med* 2005;**202**:739–750.
 7. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 2004;**95**:449–458.
 8. Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, Fini ME, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching. *Circ Res* 2004;**94**:262–268.
 9. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;**19**:71–82.
 10. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;**27**:669–692.
 11. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007;**317**:666–670.
 12. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007;**204**:3037–3047.
 13. Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 2007;**117**:2920–2928.
 14. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;**8**:211–226.
 15. Capoccia BJ, Gregory AD, Link DC. Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion. *J Leukoc Biol* 2008;**84**:760–768.
 16. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S et al. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 2004;**94**:671–677.
 17. Waeckel L, Bignon J, Liu JM, Markovits D, Ebrahimi TG, Vilar J et al. Tetrapeptide AcSDKP induces postischemic neovascularization through monocyte chemoattractant protein-1 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:773–779.
 18. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;**325**:612–616.
 19. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzik C, Spanbroek R, Llodra J et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 2007;**117**:185–194.
 20. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocyto-sis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2008;**117**:1649–1657.
 21. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007;**117**:902–909.
 22. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 2006;**7**:311–317.
 23. Engel DR, Maurer J, Tittel AP, Weisheit C, Cavlar T, Schumak B et al. CCR2 mediates homeostatic and inflammatory release of Gr1(high) monocytes from the bone marrow, but is dispensable for bladder infiltration in bacterial urinary tract infection. *J Immunol* 2008;**181**:5579–5586.
 24. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**283**:H2411–H2419.
 25. Magri D, Vasilas P, Muto A, Nishibe T, Dardik A. Elevated monocytes in patients with critical limb ischemia diminish after bypass surgery. *J Surg Res* 2009;**158**:1–11.
 26. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 2009;**113**:963–972.
 27. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;**2**:737–744.
 28. Du R, Lu KV, Petrutsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008;**13**:206–220.
 29. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 2004;**172**:4410–4417.

C/EBP Homologous Protein-10 (CHOP-10) Limits Postnatal Neovascularization Through Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Expression

Céline Loinard, Yasmine Zouggari, Patricia Rueda, Bhama Ramkhelawon, Clément Cochain, José Vilar, Alice Récalde, Adèle Richart, Dominique Charue, Micheline Duriez, Masataka Mori, Fernando Arenzana-Seisdedos, Bernard I. Lévy, Christophe Heymes and Jean-Sébastien Silvestre

Circulation. 2012;125:1014-1026; originally published online January 20, 2012;

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041830

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/125/8/1014>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2012/01/20/CIRCULATIONAHA.111.041830.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:

<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

C/EBP Homologous Protein-10 (CHOP-10) Limits Postnatal Neovascularization Through Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Expression

Céline Loinard, PhD; Yasmine Zouggar, PhD; Patricia Rueda, PhD; Bhama Ramkhelawon, PhD; Clément Cochain, PhD; José Vilar, PhD; Alice Récalde, PhD; Adèle Richart, PhD; Dominique Charue, BSc; Micheline Duriez, BSc; Masataka Mori, PhD; Fernando Arenzana-Seisdedos, PhD; Bernard I. Lévy, MD, PhD; Christophe Heymes, PhD; Jean-Sébastien Silvestre, PhD

Background—C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) is a novel developmentally regulated nuclear protein that emerges as a critical transcriptional integrator among pathways regulating differentiation, proliferation, and survival. In the present study, we analyzed the role of CHOP-10 in postnatal neovascularization.

Methods and Results—Ischemia was induced by right femoral artery ligation in wild-type and CHOP-10^{-/-} mice. In capillary structure of skeletal muscle, CHOP-10 mRNA and protein levels were upregulated by ischemia and diabetes mellitus. Angiographic score, capillary density, and foot perfusion were increased in CHOP-10^{-/-} mice compared with wild-type mice. This effect was associated with a reduction in apoptosis and an upregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) levels in ischemic legs of CHOP-10^{-/-} mice compared with wild-type mice. In agreement with these results, eNOS mRNA and protein levels were significantly upregulated in CHOP-10 short interfering RNA-transfected human endothelial cells, whereas overexpression of CHOP-10 inhibited basal transcriptional activation of the eNOS promoter. Using a chromatin immunoprecipitation assay, we also showed that CHOP-10 was bound to the eNOS promoter. Interestingly, enhanced postischemic neovascularization in CHOP-10^{-/-} mice was fully blunted in CHOP-10/eNOS double-knockout animals. Finally, we showed that induction of diabetes mellitus is associated with a marked upregulation of CHOP-10 that substantially inhibited postischemic neovascularization.

Conclusions—This study identifies CHOP-10 as an important transcription factor modulating vessel formation and maturation. (*Circulation*. 2012;125:1014-1026.)

Key Words: angiogenesis ■ CHOP-10 ■ diabetes ■ eNOS ■ ischemia ■ vasculogenesis

C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10), also known as growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 (GADD153), is a member of the CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) family of transcriptional factors that regulate cell cycle and apoptosis. CHOP-10 plays important roles in diverse cellular responses, including the regulation of cellular differentiation and proliferation and immune and inflammatory processes and is a significant mediator of apoptosis in response to endoplasmic reticulum (ER) stress.¹⁻³ Indeed, CHOP-10 is expressed at low levels under physiological conditions but is strongly induced at the transcription level in response to major sensor and transducer proteins on the ER membrane such as IRE1, ATF6, and

PERK.⁴ In particular, CHOP-10 has been identified as an ER stress-induced transcription factor that is a significant mediator of β -cell dysfunction. Hence, although CHOP-10-null mice do not have a readily detectable phenotype under basal conditions,¹ β -cells from CHOP-10-null mice are protected from apoptosis caused by accumulation of a folding-defective mutant of proinsulin or by diabetes mellitus.^{5,6}

Clinical Perspective on p 1026

Interestingly, ischemia or hypoxia has been reported to upregulate CHOP-10 mRNA through hypoxia-inducible factor-1 α -independent mechanisms.⁷ CHOP-10 is markedly induced after bilateral common carotid arteries occlusion,

Received May 5, 2011; accepted January 13, 2012.

From the Department of Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, United Kingdom (C.L.); INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center—PARCC, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France (Y.Z., B.R., C.C., J.V., A. Récalde, A. Richart, D.C., M.D., B.I.L., J.S.); INSERM U819, Unité de Pathogénie Virale Moléculaire, Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France (P.R., F.A.-S.); Laboratory of Molecular Genetics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Kumamoto, Japan (M.M.); INSERM UMR-1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France (C.H.); and Université Toulouse III, Toulouse, France (C.H.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041830/-/DC1>.

Correspondence to Jean-Sébastien Silvestre, PhD, Paris Cardiovascular Research Center, INSERM U970, Université Paris Descartes, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France. E-mail Jean-Sebastien.Silvestre@inserm.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041830

leading to damaged neurons. Ischemia-associated apoptotic loss of neurons is decreased in CHOP-10^{-/-} mice.⁸ Furthermore, hypoxia enhances CHOP-10 levels, leading to apoptosis of rat embryonic heart-derived H9c2 cells. The stable or inducible overexpression of CHOP-10 sensitizes the H9c2 cells to apoptotic cell death. In contrast, cells transiently transfected with an antisense for CHOP-10 are more resistant to hypoxia-induced apoptosis than vector control cells.^{1,9}

Although these studies suggest an essential role of CHOP-10 in the control of apoptosis, relatively little is known about the function and significance of CHOP-10 in endothelial cells and vessel growth. Homocysteine causes ER stress and growth arrest in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) through upregulation of CHOP-10.¹⁰ CHOP-10 is enhanced in fibroblast growth factor-2–overexpressing murine aortic endothelial cells or by recombinant growth factor treatment.¹¹ Finally, vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), fibroblast growth factor-2, angiogenin, and interleukin-8 are transcriptionally upregulated in multiple cell lines by various ER stress inducers.¹²

In the present study, we show that CHOP-10 regulates both apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene expression. In vivo, CHOP-10 deficiency increases eNOS expression and enhances vessel formation and maturation in physiological and pathological models of postischemic neovascularization. Thus, our data suggest an important role for CHOP-10 transcription factor in the regulation of vessel formation in the adult.

Methods

Hindlimb Ischemia

Experiments were conducted according to the French veterinary guidelines and those formulated by the European Community for experimental animal use (L358–86/609EEC). CHOP-10–deficient mice (8 weeks old; weight, 28 ± 3 g) were obtained from Dr Mori.⁵ Diabetic and nondiabetic 8-week-old wild-type (WT) C57BL/6 mice, CHOP-10–deficient mice, eNOS-deficient mice, and CHOP-10/eNOS double-deficient animals underwent surgical ligation of the proximal part of the right femoral artery, as described previously.¹³ To induce diabetes mellitus, C57BL/6 WT and CHOP-10–deficient mice were injected intraperitoneally with 60 mg/kg streptozotocin in sodium citrate buffer (0.05 mol/L, pH 4.5), daily for 5 days, as described previously.¹³ Mice were also treated with or without the antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (NAC; 200 mg/kg per day IP). In additional experiments, the superoxide dismutase mimetic 4-hydroxy-TEMPO (TEMPOL, 20 mg/kg per day; Sigma Aldrich) or saline was chronically infused by osmotic minipump (Alzet model 2002; Alza Corp) from 1 day before surgery.

Ten-week-old C57BL/6 or CHOP-10–deficient mice also underwent medullar aplasia by total body irradiation (9.5 Gy). Bone marrow cells were then isolated from femurs and tibias of C57BL/6 WT or CHOP-10–deficient mice and intravenously injected in irradiated animals. After 8 weeks, mice underwent surgical ligation of the proximal part of the right femoral artery, as described above.

Neovascularization was evaluated by 3 different methods, as described previously.¹³ For microangiography analysis, mice were anesthetized by isoflurane inhalation, and barium sulfate (3.3 g/mL) was injected into the abdominal aorta. Images were acquired with the use of a high-definition digital x-ray transducer. Vessel density was expressed as a percentage of pixels per image occupied by vessels in the quantification area. For capillary and arteriole density measurements, frozen tissue sections (7 μm) from calf or thigh muscle were incubated with rabbit polyclonal antibody directed against total fibronectin (dilution 1:50; Abcys) to identify capillaries and with

rabbit anti-mouse α-smooth muscle actin (dilution 1:100; abcam) to identify arterioles. The vessels-to-myocytes ratio was determined in both ischemic and nonischemic legs. Finally, laser Doppler perfusion imaging experiments were performed to assess limb perfusion after ischemic damage. Foot blood flow was expressed as the ratio of ischemic to nonischemic leg.

Immunohistochemistry

Calf muscles were immersed in 2.3 mol/L sucrose in phosphate-buffered saline overnight and subsequently frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Frozen sections (7 μm) were then incubated with eNOS antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and/or antibodies directed against CHOP-10 (1:100; Santa Cruz Biotechnology) and/or fluorescein isothiocyanate/Griffonia simplicifolia Agglutinin isolectin B4 (1:100; Sigma) for 30 minutes at room temperature. Finally, sections were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (1:10 000; Sigma) for 10 minutes at room temperature. Cy5 and TRITC-labeled secondary antibodies (1:200; Jackson ImmunoResearch) were then used to reveal CHOP-10– and eNOS-positive stainings, respectively.

Flow Cytometry Analysis

For analysis of eNOS expression in infiltrating cells, bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) were isolated from femurs and tibias of C57BL/6 WT and CHOP-10–deficient mice, stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (10 μmol/L; Sigma Aldrich) for 10 minutes, and intravenously injected into C57BL/6 WT mice with hindlimb ischemia. After 2 days, ischemic quadriceps, gastrocnemius, and tibialis anterior muscles were weighed, minced, and digested in 450 U/mL collagenase I, 125 U/mL collagenase XI, 60 U/mL DNaseI, and 60 U/mL hyaluronidase (Sigma Aldrich) for 1 hour at 37°C. All cell suspensions were layered on Histopaque 1083 (Sigma Aldrich) for gradient density centrifugation, and CFSE-positive cells were selected with the use of a FACSaria cell sorter (BD Biosciences).

For analysis of postischemic inflammatory response, 10-week-old CD45.1 C57BL/6 mice underwent medullar aplasia by total body irradiation (9.5 Gy). Bone marrow cells were then isolated from femurs and tibias of CD45.2 C57BL/6 WT and CD45.2 CHOP-10–deficient mice and intravenously injected in irradiated animals. After 8 weeks, mice underwent surgical ligation of the right femoral artery, as described above. Mice were then euthanized 2 days after femoral artery ligation. Ischemic gastrocnemius and tibialis anterior muscles were weighed, minced, and digested as described previously.¹⁴ All cell suspensions were layered on Histopaque 1083 (Sigma Aldrich) for gradient density centrifugation. Blood cells and ischemic muscle cells were labeled with fluorescein isothiocyanate–conjugated anti-CD45.1 (BD Biosciences), allophycocyanin–conjugated anti-CD45.2 (BD Biosciences), Pacific Blue–conjugated anti-CD11b (clone: M1/70; eBioscience), R-phycoerythrin–conjugated anti-Ly6G (clone: 1A8; BD Pharmingen), R-phycoerythrin–conjugated anti-NK-1.1 (clone: PK136), biotin anti-Ly6C (clone: AL-21; BD Pharmingen), PerCP streptavidin (BD Pharmingen), R-phycoerythrin–Cy7–conjugated anti-CD3e (BD Pharmingen), and R-phycoerythrin–conjugated anti-CD45R (clone: RA3–6B2; eBioscience). Cells were analyzed by flow cytometry with the use of an LSRII device (Becton Dickinson).

Cell Culture

HUVECs were plated in 6-well plates and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. HUVECs were obtained from Promocell (Heidelberg, Germany) and cultured in endothelial cell basal medium with supplement pack. All experiments were performed between passages 3 and 6.

RNA Interference

CHOP-10–specific short interfering RNA (siRNA) duplexes (siGENOME SMARTpool) were purchased from Dharmacon. Transfection was performed according to the manufacturer's instructions.

Luciferase Assay

Reporter gene constructs were generated with the use of the vector plasmid pGL3-Basic (Promega), which contains the luciferase gene. pGL3-eNOS-3500 contained a 3.5-kb human eNOS promoter fragment. Transfection of the GADD153 gene into HUVECs was performed with the use of an expression plasmid vector encoding human GADD153 cDNA or the control pcDNA3.⁹ HUVECs were transiently transfected with 2 mg of reporter gene and 2 mg of indicated plasmids with the use of lipofectamine transfection reagent (Invitrogen, Fischer) for 3 hours at 37°C. After 24 hours of incubation, cells were lysed in passive lysis buffer (Promega), and luciferase activity was measured with the Luciferase Assay System (Promega) with a luminometer (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems).

Chromatin Immunoprecipitation Assay

Chromatin immunoprecipitation assay was performed according to the manufacturer's instructions (Ademtech, Pessac, France). Briefly, cell lysates were incubated with an antibody against CHOP-10 (Santa Cruz Biotechnology) or polyclonal IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc). The isolated DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with primers corresponding to a 465-bp fragment (forward: 5'-GGGGCAAGGAGACGAAGAGAACAT-3' and reverse: 5'-CTGGCCCTCATTTTCCTTGGTG-3') and to a 243-bp fragment (forward: 5'-GGGGCTGGGAGGGGAAGGAT-3' and reverse: 5'-GGAGGGTTGGGCAGAAGGTGAGCA-3') of the human eNOS promoter.

Analysis of Protein Expression

Tibial anterior muscles from ischemic and nonischemic hindlimbs, aortas, and HUVECs were homogenized in RIPA buffer (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.4, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, Triton X-100 1%, deoxycholate 1%, sodium dodecyl sulfate 0.1% with protease and phosphatase inhibitors). BM-MNCs were homogenized in lysis buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L sodium orthovanadate, sodium dodecyl sulfate 1% with protease and phosphatase inhibitors). Proteins were resolved by 9% or 12% denaturing gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose sheets (Biorad, 0.2 μ m). Antibodies against VEGF-A (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), eNOS (1:1000; Becton Dickinson), and CHOP-10 (1:1000; Alexis, Coggier) were used for immunoblotting. As a protein loading control, membranes were stripped and incubated with a monoclonal antibody directed against GAPDH (1:10 000; Abcyss) or β -actin (1:10 000; Sigma), and specific chemiluminescent signal was detected as described previously.¹⁴

Quantitative Reverse Transcription PCR

cDNA synthesis was performed with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). PCR was performed on an ABI prism 7700 with the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Mouse GAPDH was used to normalize sample amplification. The following oligonucleotides (Applied Biosystems) served as primers: GAPDH forward: 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3', and reverse: 5'-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3'; eNOS forward: 5'-CGCCCCACCCAGGAGAGATCCAC-3', and reverse: 5'-GCATCGGCAGCAAAACACCAAGT-3'; CHOP-10 forward: 5'-TCAGATGAAATGGGGGCACCTA-3', and reverse: 5'-TTTCCGCTCGTTCTCTGCTCCTT-3'.

Isolation and Treatment of BM-MNCs

BM-MNCs were obtained by flushing tibia and femur of diabetic and nondiabetic WT, CHOP-10-null, eNOS-null, and CHOP-10/eNOS-deficient mice. Low-density mononuclear cells were then isolated by centrifugation on a Ficoll gradient, as described previously.¹³ Five hours after hindlimb ischemia, control animals received intravenous injections of 1×10^6 BM-MNCs. Neovascularization reaction was assessed at day 14 after ischemia, as described above. CHOP-10-deficient BM-MNCs were also treated with or without *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (NOS inhibitor, 10^{-5} mol/L; Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 1 hour before injection. The ability of cultured BM-MNCs to differentiate into cells with endo-

thelial phenotype was revealed by dual-positive staining for both AcLDL-Dil and GSA-IB4 (Griffonia Simplicifolia Agglutinin isolectin B4), as described previously.¹³

Apoptosis

Frozen tissue sections (7 μ m) from calf muscle were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with phosphate-buffered saline/bovine serum albumin and Triton 0.1% for 20 minutes at room temperature. Sections were then incubated with the In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Applied Science) for 1 hour at 37°C and with DAPI (Sigma) for 30 minutes at room temperature.

Cultured cells were incubated in serum-free medium or in serum-free medium with H₂O₂ (0.075 mmol/L + FeSO₄ 0.1 mmol/L) for 30 minutes, washed, and incubated in serum-free medium. Then they were treated with 10 nmol/L homocysteine or serum-free medium for 16 hours. The percentage of positively stained cells nuclei was determined by random counting of 10 fields per dish. The index of apoptosis was determined by counting the number of Hoechst 33342 (1 μ g/mL; Sigma)-stained nuclei of cells. Positive controls were obtained after DNase treatment of the cultured cells. Immunofluorescent images were obtained with the use of a DMRP Leica microscope with a JVC color video camera KY-F50 and were counted by coupling to an imaging analysis system (HistoLab software, Microvision, France).

NO Production

NO production in BM-MNCs was assessed by measuring intracellular nitrosation of NO-sensitive fluorochrome 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2/DA; Alexis Biochemicals). Briefly, BM-MNCs were incubated with 10 μ mol/L DAF-2/DA for 3 hours (37°C). Supernatants were then removed, and cells were washed in DAF-2/DA-free buffer followed by immediate fluorescence-activated cell sorting analysis. A Becton Dickinson FACSCalibur analyzer was used to quantify fluorescence (excitation wavelength, 488 nm; emission wavelength, 530 nm) at the single-cell level, and data were analyzed with the use of Cellquest version 3.3 (Becton Dickinson) software.

Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. To accommodate unequal variance, Welch's ANOVA was used, and comparisons between groups were then performed with Games-Howell's test when the ANOVA test was statistically significant. When variances were homogeneous, Student *t* test was used for comparing 2 groups, and 1-way ANOVA was used to compare each parameter when there were ≥ 3 independent groups. Comparisons between groups were performed with the post hoc Bonferroni *t* test when the ANOVA test was statistically significant.

Results

Ischemia Upregulates CHOP-10 Levels

We first analyzed the expression of CHOP-10 in the ischemic skeletal muscle. Two days after ischemia, CHOP-10 mRNA and protein levels were significantly increased in ischemic compared with nonischemic calf muscle (Figure 1A through 1C) and returned to basal levels at day 21 (Figure 1A and 1B), suggesting that CHOP-10 may be involved in the acute phase of postischemic vessel growth. Of note, CHOP-10 contents were also increased in the adductor muscle (Figure I in the online-only Data Supplement). Moreover, treatment with the oxidative stress inhibitors NAC or TEMPOL abrogated the ischemia-induced CHOP-10 upregulation, highlighting a role for reactive oxygen species in the regulation of CHOP-10 (Figure 1A through 1C). Finally, we showed that CHOP-10 is expressed in ischemic capillaries structure and is colocalized

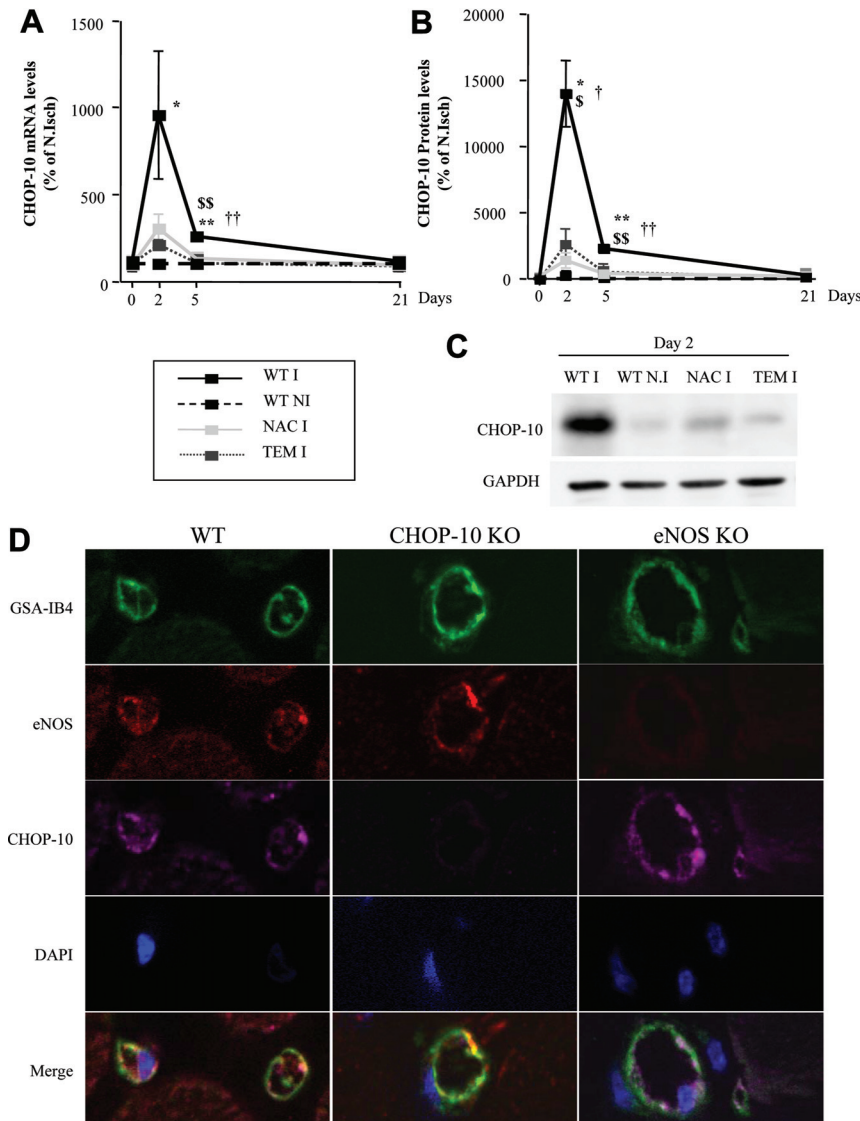


Figure 1. Time course of C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) mRNA (**A**) and protein (**B**) expression in wild-type (WT) mice treated with or without oxidative stress inhibitors antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) or TEMPOL (superoxide dismutase mimetic 4-hydroxy-TEMPO) (TEM) before and after 2, 5, and 21 days of ischemia. **C**, Representative example of a Western blot showing upregulation of CHOP-10 protein levels 2 days after surgery. Values are mean \pm SEM. * P <0.05, ** P <0.01 vs nonischemic muscle; \$ P <0.05, \$\$ P <0.01 vs ischemic muscle of NAC-treated animals; † P <0.05, ‡ P <0.01 vs ischemic muscle of TEM-treated animals; n=6. **D**, Typical example of endothelial nitric oxide synthase (eNOS)– (red staining), CHOP-10– (purple staining), and Griffonia Simplicifolia Agglutinin B4– (GSA) (green staining) positive cells in frozen sections from ischemic skeletal muscles of WT and CHOP-10–deficient animals (CHOP-10 KO). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (blue staining). Bars=10 μ m. I indicates ischemic leg; NI and N.Isch, nonischemic leg.

with eNOS-positive staining and isolectin B4 staining, a specific marker of endothelial cells (Figure 1D).

CHOP-10–Dependent Regulation of eNOS Expression

To investigate the role of CHOP-10 in the regulation of angiogenesis, we assessed the effect of CHOP-10 on 2 key proangiogenic factors involved in postischemic neovascularization: VEGF-A and eNOS. Unexpectedly, whereas VEGF-A protein levels were unchanged (Figure II in the online-only Data Supplement), eNOS mRNA and protein levels were increased in ischemic muscle of CHOP-10 knockout mice compared with WT mice as early as day 2 after the onset of ischemia and throughout the experiment (Figure 2A). eNOS mRNA and protein levels were also significantly increased in the aorta of CHOP-10–null animals compared with WT animals (Figure 2B), suggesting that eNOS is a CHOP-10–regulated gene in vivo. Consistent with these results, treatment of cultured HUVECs with homocysteine (5 nmol/L, 4 hours) increased CHOP-10 mRNA levels (P <0.01; Figure 2C and Figure III in the online-only Data Supplement) and downregulated eNOS

mRNA and protein contents (Figure 2D and 2E). Interestingly, CHOP-10 siRNA prevented the downregulation of eNOS mRNA and protein levels induced by homocysteine (Figure 2D and 2E). Finally, overexpression of CHOP-10 significantly inhibited the basal transcriptional activation of the eNOS promoter, as assessed by a reporter gene assay with the use of a fragment of the human eNOS gene (Figure 2F). Indeed, promoter analysis revealed that the eNOS promoter contains a conserved optimal CHOP-10–responsive element (CCAAT; <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Chromatin immunoprecipitation assays demonstrated that CHOP-10 bound to the eNOS promoter encompassing this DNA-binding element in position 757 to 1222 bp and 2843 to 3086 bp. However, no binding was detected when immunoprecipitation was performed with the use of IgG, which confirmed the specificity of the CHOP-10/eNOS promoter interaction (Figure 2G).

CHOP-10 Is a Modulator of Postnatal Neovascularization

To determine the in vivo significance of these findings, we assessed the role of CHOP-10 in postischemic vessel growth.

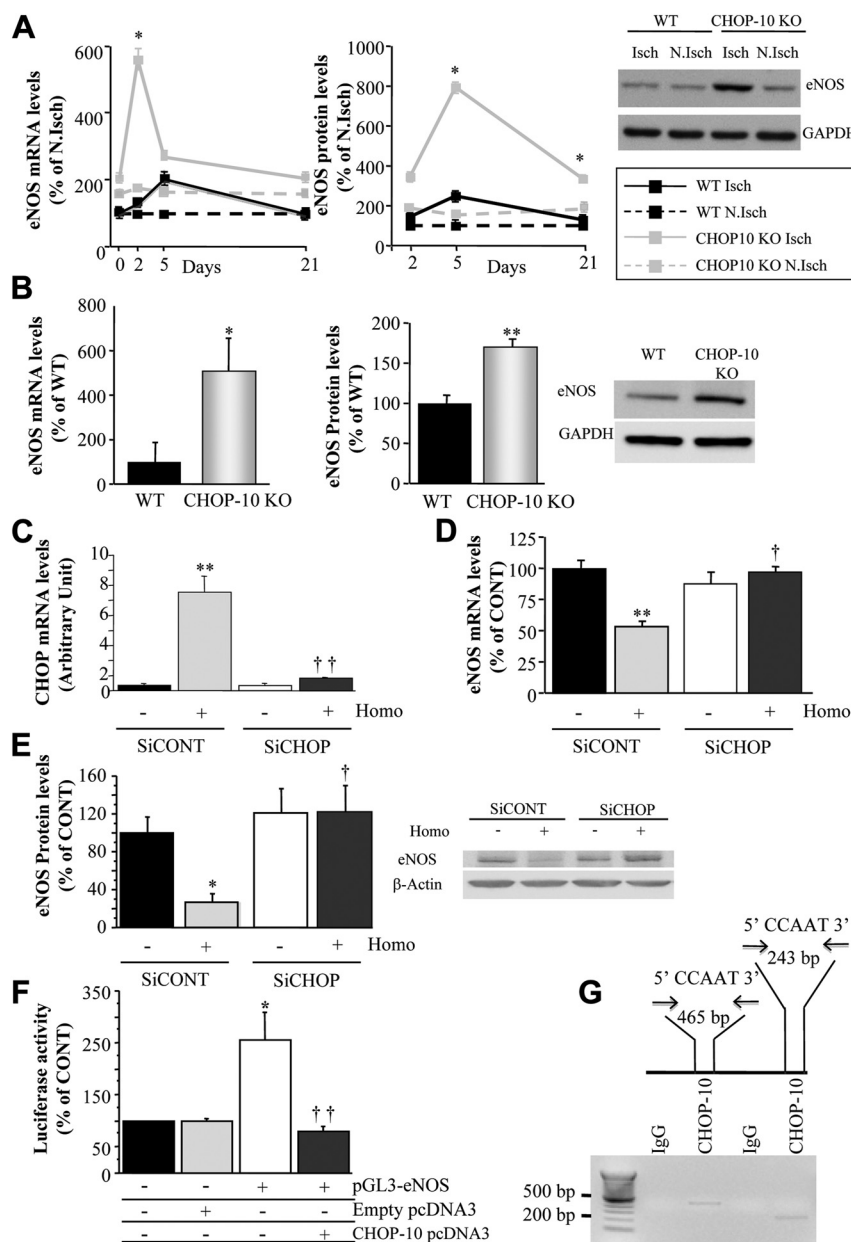


Figure 2. A, Quantitative evaluation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and protein levels in calf muscle of wild-type (WT) and C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) knockout (KO) mice. Right, representative Western blot of eNOS contents in ischemic (Isch) and nonischemic (N.Isch) calf muscle. For mRNA level analysis, with 120 possible comparisons for Bonferroni correction, a value of $P < 0.00041$ was considered significant. $*P < 0.00041$, WT mice; for protein levels analysis, with 66 possible comparisons, for Bonferroni correction, a value of $P < 0.00075$ was considered significant. $*P < 0.00075$ vs WT mice; $n = 6$. B, Quantification of eNOS mRNA and protein levels in aorta of WT and CHOP-10 KO mice. Right, representative Western blot of eNOS regulation. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs WT mice; $n = 6$. Quantification of CHOP-10 mRNA (C), eNOS mRNA (D), and eNOS protein (E) levels in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with or without homocysteine (Homo) that were transfected with a CHOP-10-specific short interfering RNA (siRNA) (SiCHOP) or a scrambled oligonucleotide siRNA (SiCONT). Data are presented as mean \pm SEM; with 6 comparisons made for Bonferroni correction, a value of $P < 0.008$ was considered significant. $*P < 0.008$, $**P < 0.0016$ vs HUVECs transfected with a scrambled oligonucleotide siRNA; $\dagger P < 0.008$, $\ddagger P < 0.0016$ vs HUVECs treated with homocysteine and transfected with a scrambled oligonucleotide siRNA; $n = 8$. F, HUVECs were transfected with or without the empty vector pcDNA3 or pGL3-eNOS3500 (eNOS) or cotransfected with pGL3-eNOS3500 and CHOP-10 pcDNA3. Luciferase activity was measured 24 hours later. Data are presented as mean \pm SEM. With 6 possible comparisons made for Bonferroni correction, a value of $P < 0.008$ was considered significant. $*P < 0.008$ vs HUVECs transfected with empty pcDNA3; $\dagger P < 0.0016$ vs HUVECs cotransfected with pGL3-eNOS3500 and CHOP-10 pcDNA3; $n = 6$. G, Chromatin-bound DNA was immunoprecipitated with IgG (negative control) or an antibody directed against CHOP-10. Immunoprecipitated DNA was analyzed by polymerase chain reaction with a primer combination that encompassed eNOS promoter. Polymerase chain reaction analysis revealed 2 CHOP-10-responsive elements (CCAAT) of 465 and 243 bp.

Angiographic score was increased by 2-fold in CHOP-10 knockout animals compared with WT mice (Figure 3A). This was confirmed by capillary density evaluation and measurements of foot perfusion and arteri-

ole number (Figure 3B through 3D). To further support the role of eNOS in these effects, we generated CHOP-10/eNOS double-deficient animals. Interestingly, the proangiogenic effect of CHOP-10 deficiency was fully blunted

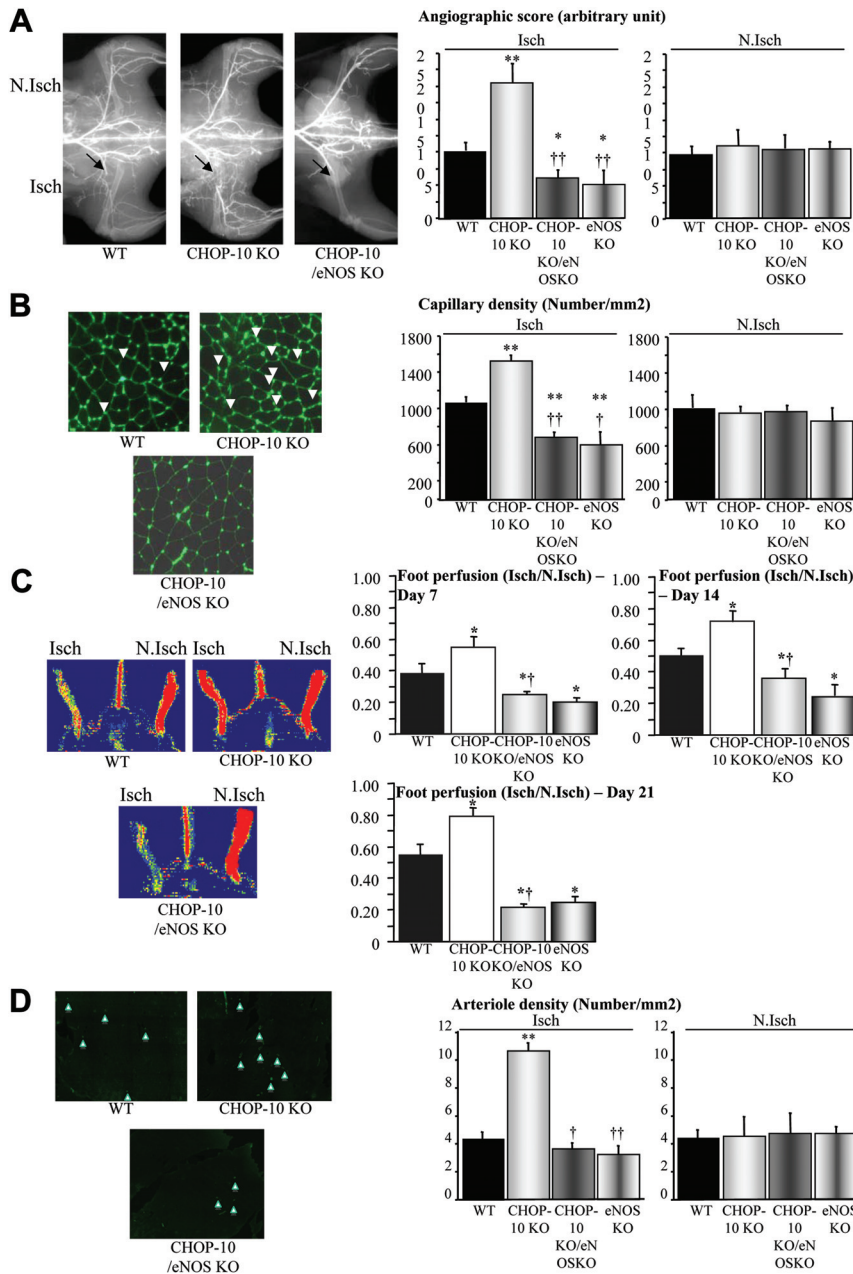


Figure 3. Quantitative evaluation and representative photomicrographs of microangiography (A), capillary density (calf muscle) (B), foot perfusion (C), and arteriole density (adductor muscle) (D) in wild-type (WT), C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) knockout (KO) endothelial nitric oxide synthase (eNOS) KO, and eNOS/CHOP-10 KO mice after 21 days of ischemia. Results are shown in ischemic (Isch) and nonischemic (N.Isch) legs. Values are mean \pm SEM; with 6 possible comparisons for Bonferroni correction, a value of $P < 0.008$ was considered significant. * $P < 0.008$, ** $P < 0.0016$ vs WT; † $P < 0.008$, ‡ $P < 0.0016$ vs CHOP-10 KO; $n = 8$.

in these animals. In this regard, postischemic vessel growth was similar in CHOP-10/eNOS-deficient animals and eNOS knockout mice (Figure 3). Altogether, these results support the concept that transcriptional repression of eNOS by CHOP-10 might contribute to the antiangiogenic effects of CHOP-10.

Because BM-MNCs have been shown to contribute to postnatal vessel growth, we also assessed the ability of CHOP-10 to control BM-MNC-related effects. WT BM-MNCs expressed CHOP-10 mRNA levels (data not shown). eNOS mRNA and protein levels were increased by 7.4- and 3-fold, respectively, in CHOP-10 knockout BM-MNCs compared with WT BM-MNCs (Figure 4A). This increase was associated with enhanced NO production (Figure 4B). Of interest, eNOS mRNA and protein levels were also upregulated in CFSE-labeled BM-MNCs infil-

trating the ischemic leg (Figure 4C). Intravenous administration of CHOP-10 knockout BM-MNCs markedly increased postischemic neovascularization compared with that of WT BM-MNCs. Inhibition of eNOS activity by pretreatment with L-NAME or by using CHOP-10/eNOS double-deficient cells fully abrogated the proangiogenic effect of CHOP-10 knockout BM-MNCs (Figure 4D through 4F).

To support the role of CHOP-10 in endogenous BM-MNC-related effects, we also analyzed postischemic revascularization in WT CD45.1 mice reconstituted with bone marrow isolated from CD45.2 C57BL/6 WT or CD45.2 CHOP-10-deficient mice. After hindlimb ischemia, neovascularization was increased in WT mice reconstituted with CHOP-10 knockout bone marrow compared with WT mice reconstituted with WT bone marrow,

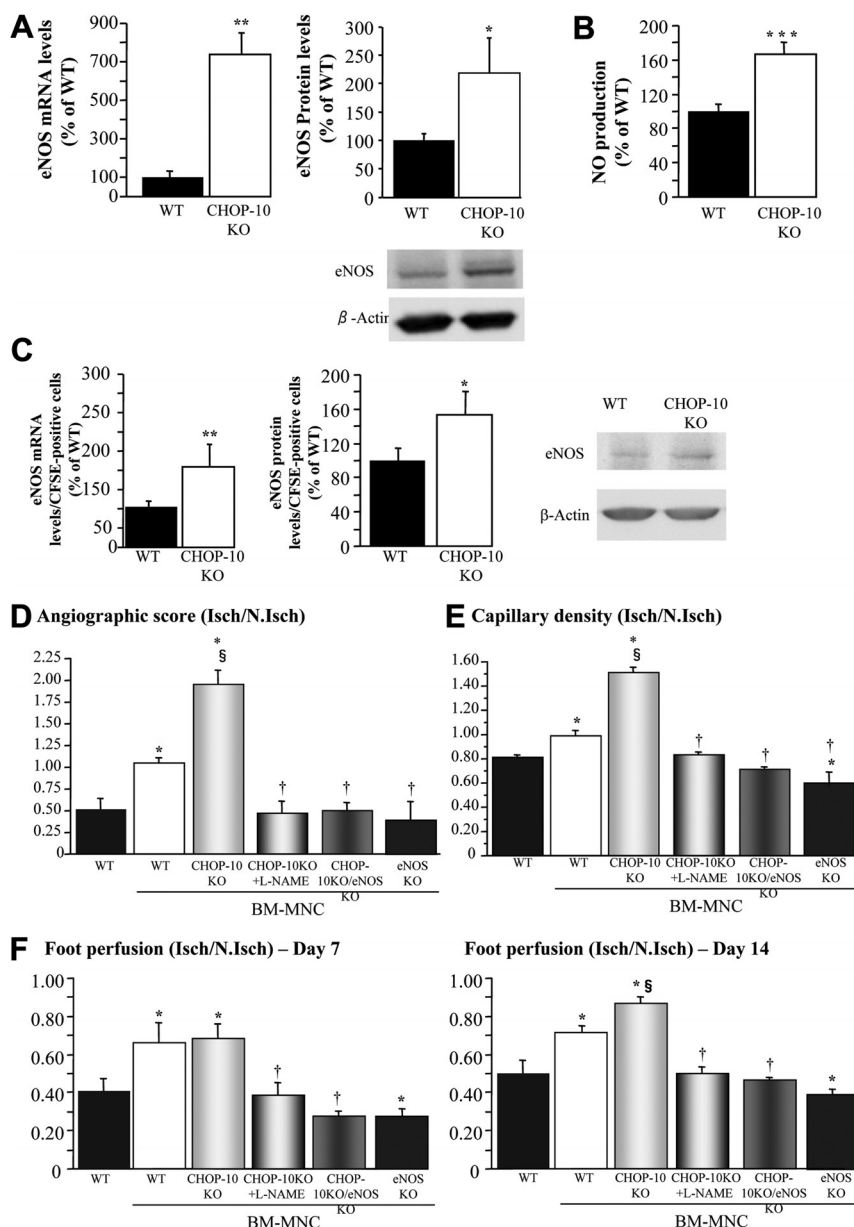


Figure 4. **A**, Top, Quantification of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and protein levels and **(B)** NO production in bone marrow mononuclear cells (BM-MNC) isolated from wild-type (WT) and C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10)-deficient mice. Bottom, Representative Western blot of eNOS protein levels. **C**, Quantification of eNOS mRNA and protein levels in carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-positive cells infiltrating the ischemic muscle; $n=10$.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs WT. Quantitative evaluation of microangiography **(D)**, capillary density **(E)**, and foot perfusion **(F)** in ischemic WT mice receiving treated and untreated BM-MNCs 14 days after ischemia. Data are presented as mean \pm SEM; with 15 possible comparisons for Bonferroni correction, a value of $P<0.003$ was considered significant.

* $P<0.003$ vs WT; § $P<0.003$ vs WT mice injected with WT BM-MNC; † $P<0.003$ vs WT mice injected with CHOP-10 KO BM-MNC; $n=8$. L-NAME indicates N^G -nitro-L-arginine methyl ester.

demonstrating that endogenous BM-MNC-derived CHOP-10 is important for basal postischemic neovascularization (Figure 5A). This effect was associated with activation of postischemic inflammatory response. In ischemic muscles, we showed that the numbers of CD45.2-positive cells, monocytes (CD45.2⁺/CD11b⁺/Ly6G⁺ cells), and T lymphocytes (CD45.2/CD3⁺ cells) were higher in WT mice reconstituted with CHOP-10 knockout bone marrow compared with WT mice reconstituted with WT bone marrow (Figure 5B), indicating that the increase in postischemic immunoinflammatory response may also participate in the beneficial effects observed in this context. Similarly, the number of CD45.2-positive cells was higher in the blood of WT mice reconstituted with CHOP-10 knockout bone marrow compared with WT mice reconstituted with WT bone marrow (Figure 5C). In addition, CHOP-10-null BM-MNCs were more resistant to H₂O₂- and homocysteine-induced apoptosis through an

NO-independent pathway (Figure IV in the online-only Data Supplement). In contrast, the ability of BM-MNCs to differentiate into cells with an endothelial phenotype was unaffected by CHOP-10 deficiency (Figure IV in the online-only Data Supplement).

To determine the critical source of CHOP-10 (ie, bone marrow-derived cells or endothelial cells) in terms of the neovascularization reaction, we also analyzed vessel growth in CHOP-10 knockout mice reconstituted with bone marrow isolated from C57BL/6 WT or CHOP-10-deficient animals. We showed that postischemic revascularization was higher in chimeric WT mice reconstituted with CHOP-10 knockout bone marrow compared with chimeric WT mice reconstituted with WT bone marrow (Figure 5A). Altogether, our results suggest that CHOP-10 may regulate postischemic vessel growth by modulating the angiogenic contributions of both endothelial cells and BM-MNCs to neovascularization.

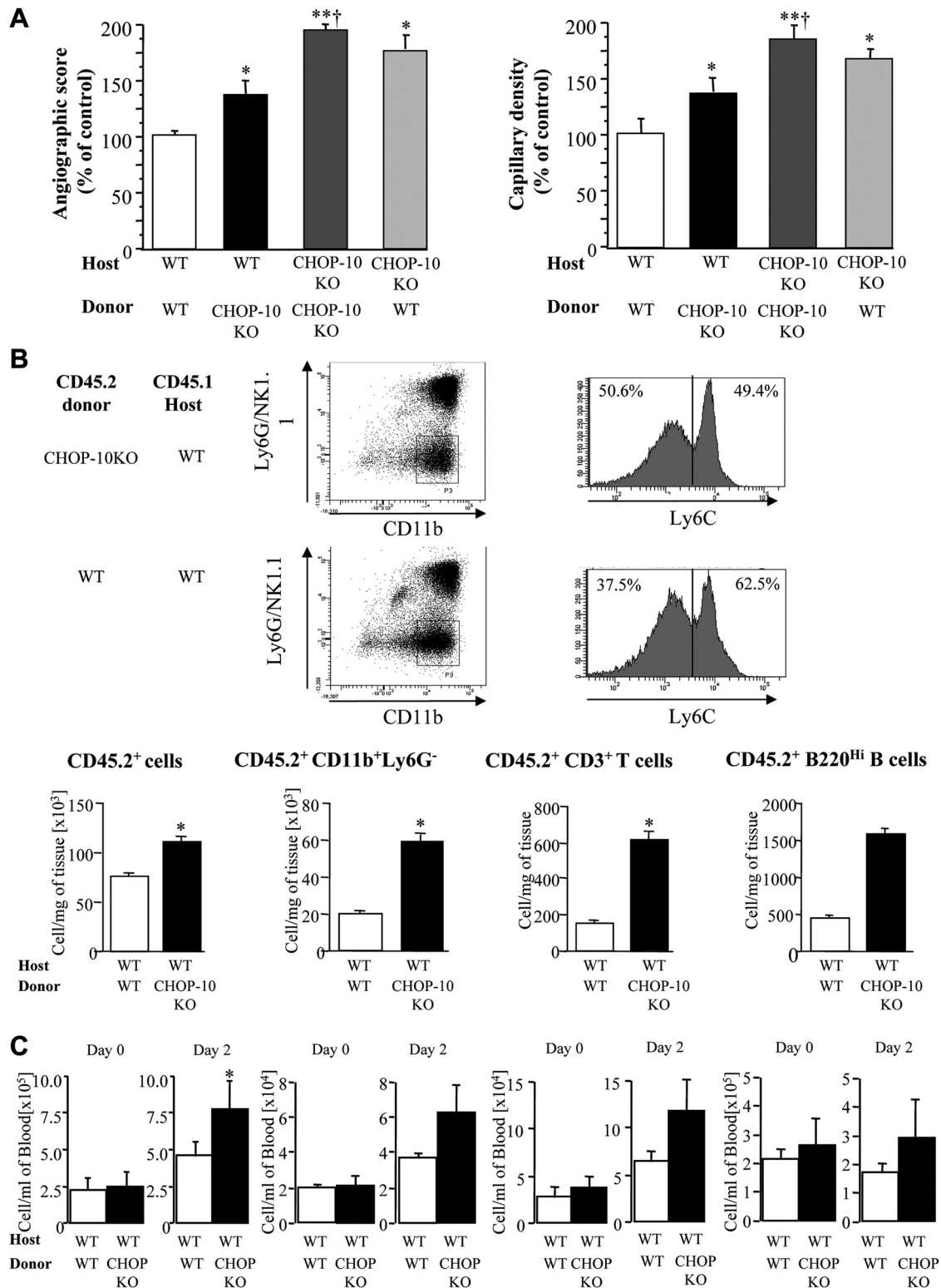


Figure 5. **A**, Quantitative evaluation of microangiography and capillary density in ischemic wild-type (WT) or C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10)-deficient (CHOP-10 KO) mice lethally irradiated and transplanted with bone marrow mononuclear cells (BM-MNC) isolated from WT or CHOP-10-deficient animals. Data are presented as mean \pm SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs chimeric WT animals transplanted with WT BM-MNC; † P < 0.05 vs chimeric WT mice transplanted with CHOP-10 KO BM-MNC; n = 10. **B**, Top, Representative flow cytometry scattergraph of Ly6C-positive cells. Plots are gated on CD11b-positive cells. Ly6C expression was divided into low- and high-positive cells. Number in each quadrant indicates percentages of cells. Bottom, Quantitative and phenotypic analysis of infiltrating CD45.2 BM-MNC isolated from WT or CHOP-10 KO mice transplanted into lethally irradiated CD45.1 WT animals. The number of CD45.2⁺ (total number of cells); CD45.2⁺/CD11b⁺/Ly6G⁻ (monocytes; the granulocyte marker Ly6G discriminates neutrophils from cells expressing monocytic markers); CD45.2⁺/CD3⁺ (T lymphocytes); and CD45.2⁺/B220^{High} (B lymphocytes) was measured in the ischemic muscle of chimeric CD45.1 WT mice 2 days after the onset of ischemia. Data are presented as mean \pm SEM. * P < 0.05 vs

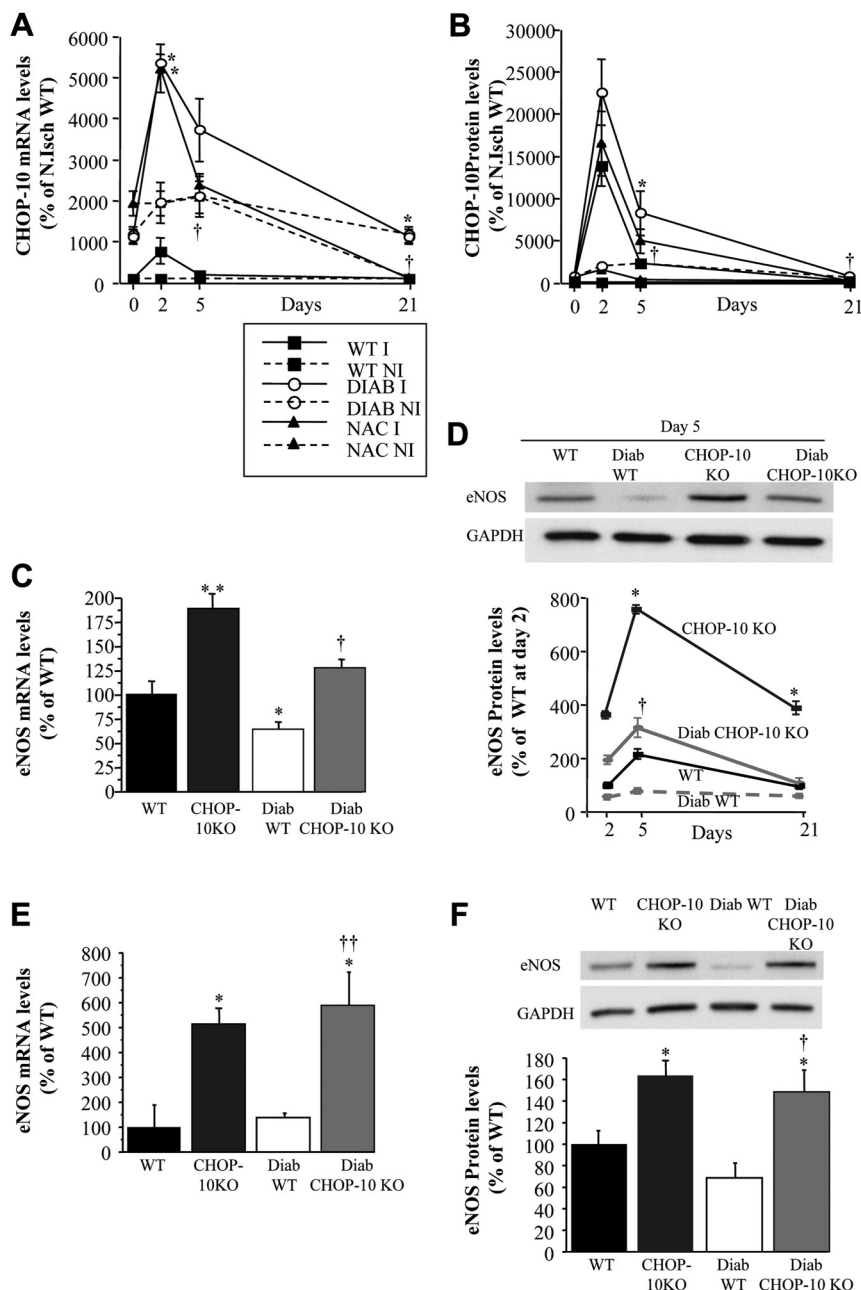


Figure 6. Quantification of C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) mRNA (**A**) and protein (**B**) levels in calf muscle of wild-type (WT), diabetic WT (Diab), and diabetic WT treated with NAC (NAC) mice 2, 5, and 21 days after ischemia. Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs WT ischemic muscle; † $P < 0.05$ vs diabetic WT ischemic muscle; $n = 7$. Quantitative evaluation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and protein levels in calf muscle (**C** and **D**) and aorta (**E** and **F**) of WT, CHOP-10-null animals (CHOP-10 KO), diabetic WT (Diab), and diabetic CHOP-10-deficient mice (Diab CHOP-10 KO). Values are mean \pm SEM. With 66 possible comparisons for Bonferroni correction, a value of $P < 0.00075$ was considered significant. * $P < 0.00075$ vs WT mice; † $P < 0.00075$ vs diabetic WT mice. $n = 7$. I indicates ischemic; NI and N.Isch, nonischemic.

CHOP-10 Upregulation Participates in Diabetes Mellitus-Induced Impairment of Vessel Formation

To further validate the *in vivo* relevance of CHOP-10 for postnatal neovascularization, we investigated the effect of CHOP-10 deficiency in diabetes mellitus. Diabetes mellitus-induced reactive oxygen species overproduction impairs post-ischemic neovascularization.¹⁵ Of interest, CHOP-10 has been shown to be increased by reactive oxygen species and to trigger oxidative stress-induced β -cell apoptosis in diabetes mellitus.⁶

Blood glucose levels were similar in diabetic WT and diabetic CHOP-10 knockout animals (591 versus 595 mg/dL, respectively; $n = 13$).

Diabetes mellitus markedly upregulated CHOP-10 mRNA and protein levels in ischemic leg (Figure 6A and 6B). Interestingly, treatment with the oxidative stress inhibitor NAC abolished the ischemia-induced increase of CHOP-10 in diabetic tissue, suggesting that diabetes mellitus-induced reactive oxygen species overproduction controls CHOP-10 levels (Figure 6A and 6B).

Figure 5 (Continued). chimeric CD45.1 WT mice transplanted with CD45.2 WT BM-MNC; $n = 5$. **C**, Quantitative analysis of the number of CD45.2⁺ (total number of cells); CD45.2⁺/CD11b⁺/Ly6G⁺ (monocytes); CD45.2⁺/CD3⁺ (T lymphocytes); and CD45.2⁺/B220^{high} (B lymphocytes) in the blood of chimeric CD45.1 WT mice before (day 0) and 2 days after (day 2) the onset of ischemia. * $P < 0.05$ vs chimeric CD45.1 WT mice transplanted with CD45.2 WT BM-MNC; $n = 5$.

In the ischemic calf, CHOP-10 deletion led to an increase in eNOS mRNA and protein levels in diabetic CHOP-10-deficient mice compared with the diabetic WT group (Figure 6C and 6D). eNOS mRNA and protein levels were also increased in the aorta of diabetic CHOP-10-deficient mice compared with those of WT diabetic animals (Figure 6E and 6F). There was no significant difference in the VEGF contents of WT and CHOP-10-deficient diabetic animals (Figure V in the online-only Data Supplement). CHOP-10 deletion was also associated with a decrease in the number of apoptotic cells at 2 (7.5-fold; $P<0.001$) and 7 (45-fold; $P<0.001$) days after the onset of ischemia in diabetic CHOP-10-deficient mice compared with diabetic WT animals (Figure V in the online-only Data Supplement). Interestingly, CHOP-10 deletion-induced changes in eNOS and apoptosis were associated with activation of vessel growth despite the diabetic environment. Hence, angiographic score (3.3-fold; $P<0.01$; Figure 7A), capillary density (1.8-fold; $P<0.001$; Figure 7B), and foot perfusion (2.2-fold; $P<0.001$; Figure 7C) were increased in the diabetic CHOP-10 knockout group compared with the diabetic WT group.

Similarly, the diabetic BM-MNC proangiogenic effect was enhanced by CHOP-10 deficiency. CHOP-10 mRNA and protein levels were increased in diabetic BM-MNCs compared with WT and NAC-treated diabetic BM-MNCs (Figure VI in the online-only Data Supplement). eNOS mRNA (2-fold; $P<0.001$; Figure VI in the online-only Data Supplement) and protein (2.4-fold; $P<0.001$; Figure VI in the online-only Data Supplement) levels were increased in BM-MNCs isolated from diabetic CHOP-10 knockout compared with those isolated from diabetic WT mice. This increase in eNOS content was associated with an upregulation of NO production (Figure VI in the online-only Data Supplement). Interestingly, angiographic score (1.8-fold; $P<0.05$; Figure 8A), capillary density (1.8-fold; $P<0.001$; Figure 8B), and foot perfusion (1.7-fold; $P<0.01$; Figure 8C) were increased in ischemic WT mice treated with diabetic CHOP-10 knockout BM-MNCs compared with those receiving diabetic WT BM-MNCs. Furthermore, the number of cells double positive for Dil-LDL and GSA-IB4 lectin was increased by CHOP-10 deficiency (Figure 8D), whereas the number of apoptotic cells was reduced, suggesting that CHOP-10 participates in diabetes mellitus-induced apoptosis and inhibition of BM-MNC differentiation and that a loss of CHOP-10 function activates postnatal vasculogenesis despite the diabetic microenvironment (Figure 8E).

Discussion

Although CHOP-10 transcription factor of the C/EBP family may be involved in cell differentiation, growth, and survival, its role in the regulation of postnatal neovascularization has not been defined. This study identifies CHOP-10 as a major modulator of vessel formation and maturation.

The physiological significance of CHOP-10 in the vasculature is validated by the observation that ischemia and diabetes mellitus-induced reactive oxygen species overproduction upregulated CHOP-10 levels and that CHOP-10 deficiency markedly improved postischemic vessel growth in control animals but also in a pathological setting, such as

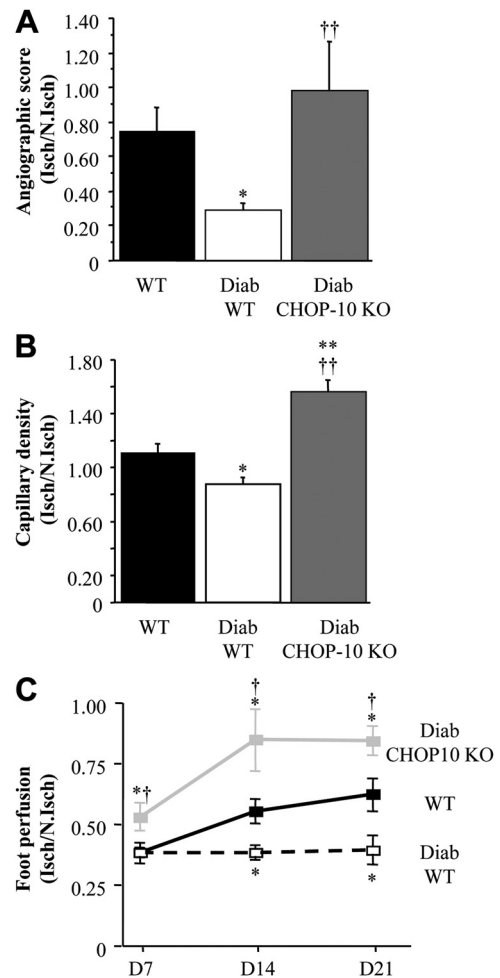


Figure 7. Quantitative evaluation of microangiography (A) and capillary density (B) in wild-type (WT), diabetic WT (Diab WT), and diabetic C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) knockout (KO) mice (Diab CHOP-10KO) 21 days after ischemia. Results are expressed as a ratio of ischemic (Isch) to nonischemic (N.Isch) legs. Values are mean \pm SEM. With 3 possible comparisons for Bonferroni correction, $P<0.016$ was considered significant. * $P<0.016$, ** $P<0.003$ vs WT; † $P<0.016$, ‡ $P<0.003$ vs diabetic WT; $n=10$. C, Quantitative analysis of foot perfusion. Results are expressed as a ratio of ischemic to nonischemic legs. Values are mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs WT; † $P<0.05$ vs diabetic WT; $n=10$.

diabetes mellitus. Of note, CHOP-10 is only 1 of multiple mechanisms that contribute to diabetes mellitus-induced impairment of postischemic vessel growth.^{13,16}

Our data demonstrated that the transcriptional repression of eNOS by CHOP-10 greatly contributes to the antiangiogenic effects of CHOP-10. Indeed, CHOP-10 is a negative modulator of the activity of C/EBP-like proteins, and C/EBP response elements have been shown in eNOS gene promoter.¹⁷ As such, knockdown of CHOP-10 gene expression with the use of specific siRNA induced a marked increase in eNOS mRNA and protein levels in homocysteine-treated endothelial cells. Moreover, eNOS expression was enhanced in aorta and ischemic muscle of CHOP-10-deficient mice, indicating that eNOS is a CHOP-10-regulated gene in vivo. Evidence for a direct effect of CHOP-10 on eNOS transcription was obtained by chromatin immunoprecipitation and the

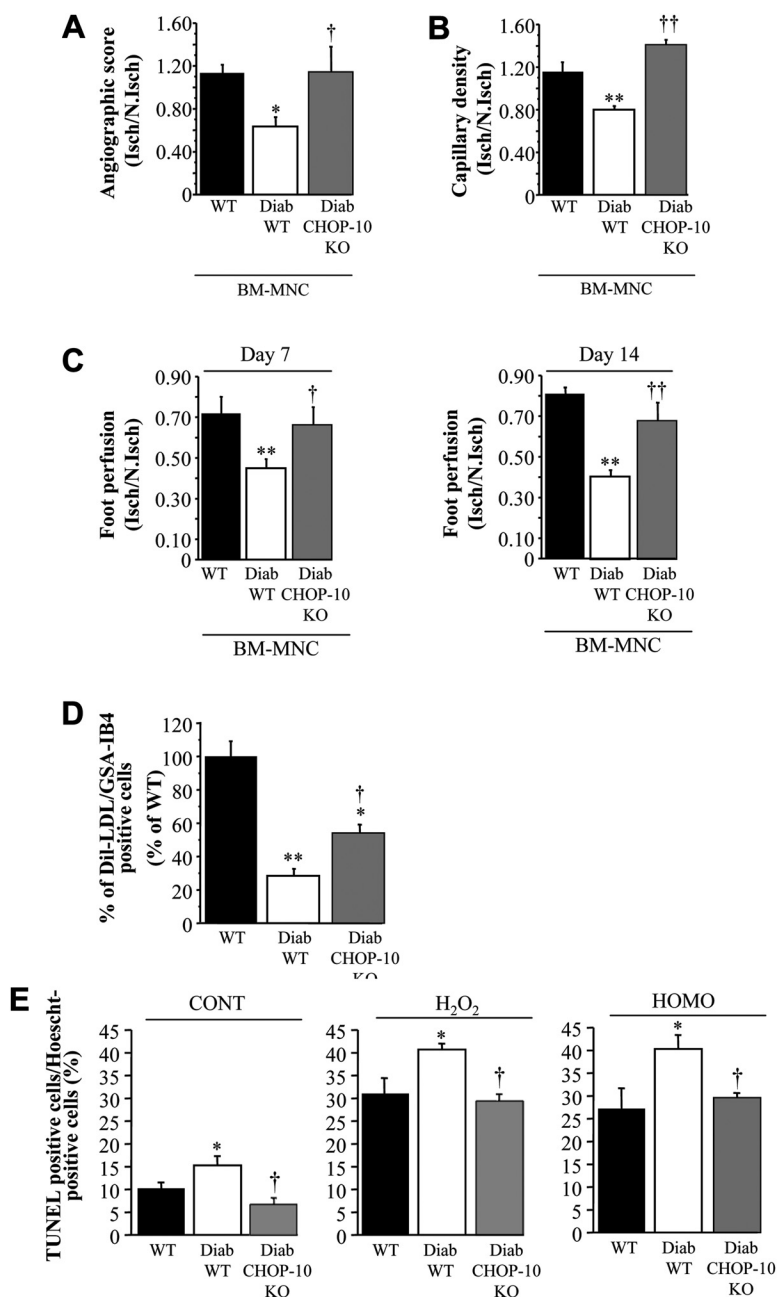


Figure 8. Quantitative evaluation of microangiography (A), capillary density (B), and foot perfusion (C) in ischemic wild-type (WT) mice receiving bone marrow mononuclear cells (BM-MNC) isolated from WT, diabetic WT (Diab WT), and diabetic C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) knock-out (KO) (Diab CHOP-10 KO) mice 14 days after ischemia. Results are expressed as a ratio of ischemic (Isch) to nonischemic (N.Isch) legs. Data are presented as mean±SEM. With 3 possible comparisons for Bonferroni correction, $P<0.016$ was considered significant. * $P<0.016$, ** $P<0.0033$ vs mice treated with WT BM-MNC; † $P<0.016$, ‡ $P<0.0033$ vs mice treated with diabetic WT BM-MNC; n=9. **D**, Quantification of AcLDL-Dil- and BS-1 lectin-positive cells of cultured BM-MNC isolated from WT, diabetic WT, and diabetic CHOP-10 KO animals. With 3 possible comparisons for Bonferroni correction, $P<0.016$ was considered significant. * $P<0.016$, ** $P<0.0033$ vs mice treated with WT BM-MNC; † $P<0.016$ vs mice treated with diabetic WT BM-MNC. **E**, Number of cells positive for both Hoechst and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining after treatment of BM-MNC with H₂O₂ (0.075 mmol/L) or homocysteine (HOMO) (10 nmol/L). CONT indicates control. Data are presented as mean±SEM. With 3 possible comparisons for Bonferroni correction, $P<0.016$ was considered significant. * $P<0.016$ vs WT BM-MNC; † $P<0.016$ vs diabetic WT BM-MNC. n=9.

observation that overexpression of a gain of function of CHOP-10 significantly inhibited basal promoter activity of a reporter gene driven by the human eNOS promoter. Finally, activation of vessel growth associated with CHOP-10 deficiency was fully abrogated in mice lacking eNOS.

Endothelial-derived NO is essential for blood vessel growth after arterial occlusion mediating endothelial cell growth,¹⁸ migration,¹⁹ vascular remodeling,²⁰ angiogenesis,^{18,21} vasodilation,²² and bone marrow-derived cell-related functions.^{13,23} Hence, activation of eNOS-related signaling induced by CHOP-10 deficiency may trigger numerous pathways required for postnatal angiogenesis and vasculogenesis. Although there is some in vitro evidence indicating that NO may upregulate VEGF gene expression in various cell types,^{24–26} CHOP-10 knockout mice, despite eNOS upregu-

lation, have normal levels of VEGF. Similarly, basal and time-dependent VEGF expressions in ischemic muscles do not differ between eNOS-overexpressing and WT mice.²⁷ The reason for this discrepancy remains enigmatic but may underscore the multiple cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of VEGF in the ischemic tissues.

In addition, it is likely that CHOP-10 controls several other target genes implicated in vessel formation and stabilization, such as those modulating the apoptotic pathway. Indeed, CHOP-10 has been shown to mediate ER stress-induced cell death through downregulation of Bcl2 and enhanced oxidant injury.³ In this regard, homocysteine- and H₂O₂-induced BM-MNC death, as well as the number of apoptotic cells in ischemic tissue, was reduced in CHOP-10 knockout mice. It is noteworthy that eNOS deficiency did not affect the number

of apoptotic cells, suggesting that CHOP-10 controls cell death through an eNOS-independent pathway.

This study also highlights the role of ER stress in adult neovascularization. The ER has emerged as a major site of cellular homeostasis, particularly for the unfolded protein response, which has been shown to play a major role in cancer and many other diseases. Under various conditions such as disturbance of Ca^{2+} homeostasis, hypoxia, hypoglycemia, and treatment with various agents, ER functions are disturbed and ER stress is induced. For example, the inducible ER chaperone ORP150 has been shown to control the processing of VEGF and tumor-mediated angiogenesis.²⁸ A major protective response to ER stress is also the induction of the ER chaperone GRP78/BiP, which is expressed at high levels in a variety of tumors and confers drug resistance in both proliferating and dormant cancer cells.²⁹ Hence, activation of CHOP-10 in the setting of ischemia and its angiostatic effect may be part of the evolutionarily conserved mechanism that activates both proapoptotic and survival pathways to allow eukaryotic cells to adapt to ER stress.

In both genetic and diet-induced models of insulin resistance, CHOP deficiency improves glycemic control, expands β -cell mass, and promotes cell survival.⁶ Interestingly, mice deficient for VEGF-A in pancreatic islets have reduced insulin gene expression levels and impaired glucose tolerance.^{30,31} In this regard, the capillary network is essential for fine-tuning blood glucose regulation,³² suggesting that the angiostatic potential of CHOP-10 may participate in β -cell dysfunction under conditions of increased insulin demand. It is noteworthy that in our experimental conditions, the effect of CHOP-10 deficiency on postnatal vessel growth is not associated with changes in blood glucose levels.

In conclusion, this work suggests that CHOP-10 functions as a major regulator of postnatal neovascularization through regulation of eNOS-related signaling.

Acknowledgments

We are thankful to Dr Dae-Ghon Kim (Chonbuk National University Medical School and Hospital, South Korea) for the kind gift of pcDNA CHOP-10 and to Dr Li Huige for the kind gift of pGL3-eNOS-3500 (Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany).

Sources of Funding

Dr Silvestre is supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ANR TecSan 2008 project Glassbone, ANR Chemrepair (2010 BLAN 1127 02), and fondation Leducq transatlantic network (09-CVD-01). Dr Silvestre is a recipient of a Contrat d'Interface from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

Disclosures

None.

References

1. Zinsner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998;12:982–995.
2. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004;18:3066–3077.
3. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. GADD153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1249–1259.
4. Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:663–674.
5. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M. Targeted disruption of the CHOP gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest.* 2002;109:525–532.
6. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. CHOP deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest.* 2008;118:3378–3389.
7. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;394:485–490.
8. Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI, Ushio Y, Mori M. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.* 2004;11:403–415.
9. Han XJ, Chae JK, Lee MJ, You KR, Lee BH, Kim DG. Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxia-induced apoptosis of h9c2 cells. *J Biol Chem.* 2005;280:23122–23129.
10. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood.* 1999;94:959–967.
11. Dell'Era P, Coco L, Ronca R, Sennino B, Presta M. Gene expression profile in fibroblast growth factor 2-transformed endothelial cells. *Oncogene.* 2002;21:2433–2440.
12. Pereira ER, Liao N, Neale GA, Hendershot LM. Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS ONE.* 2010;5.
13. Mees B, Recalde A, Loinard C, Tempel D, Godinho M, Vilar J, van Haperen R, Levy B, de Crom R, Silvestre JS. Endothelial nitric oxide synthase overexpression restores the efficiency of bone marrow mononuclear cell-based therapy. *Am J Pathol.* 2011;178:55–60.
14. Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Recalde A, Richart AL, Loinard C, Zouggar Y, Guerin C, Duriez M, Combadiere B, Poupel L, Levy BI, Mallat Z, Combadiere C, Silvestre JS. Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2010;88:186–195.
15. Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, Waeckel L, Duriez M, Vilar J, Brandes RP, Levy BI, Shah AM, Silvestre JS. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs post-ischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol.* 2006;169:719–728.
16. Caporali A, Meloni M, Vollenkle C, Bonci D, Sala-Newby GB, Addis R, Spinetti G, Losa S, Masson R, Baker AH, Agami R, le Sage C, Condorelli G, Madeddu P, Martelli F, Emanuelli C. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation.* 2011;123:282–291.
17. Karantzioulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GK, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem.* 1999;274:3076–3093.
18. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest.* 1994;94:2036–2044.
19. Murohara T, Witzensichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1156–1161.
20. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest.* 1998;101:731–736.
21. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998;101:2567–2578.
22. Mees B, Wagner S, Ninci E, Tribulova S, Martin S, van Haperen R, Kostin S, Heil M, de Crom R, Schaper W. Endothelial nitric oxide

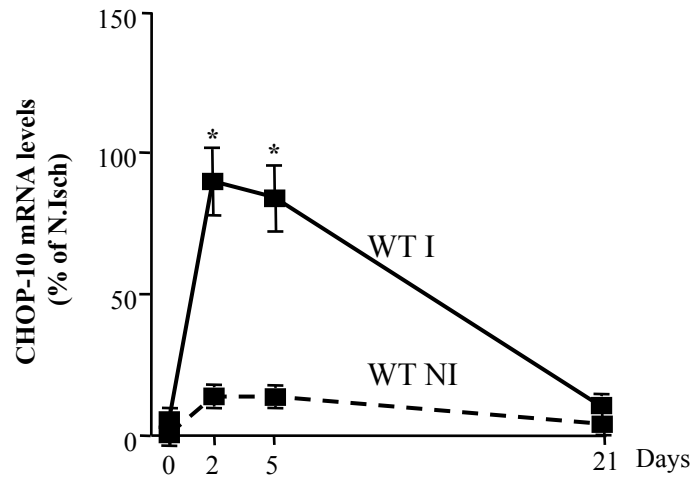
- synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1926–1933.
23. You D, Waeckel L, Ebrahimian TG, Blanc-Brude O, Foubert P, Barateau V, Duriez M, Lericousse-Roussanne S, Vilar J, Dejana E, Tobelem G, Levy BI, Silvestre JS. Increase in vascular permeability and vasodilation are critical for proangiogenic effects of stem cell therapy. *Circulation.* 2006;114:328–338.
 24. Jozkowicz A, Cooke JP, Guevara I, Huk I, Funovics P, Pachinger O, Weidinger F, Dulak J. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res.* 2001;51:773–783.
 25. Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene.* 1997;15:437–442.
 26. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood.* 2000;95:189–197.
 27. Amano K, Matsubara H, Iba O, Okigaki M, Fujiyama S, Imada T, Kojima H, Nozawa Y, Kawashima S, Yokoyama M, Iwasaka T. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension.* 2003;41:156–162.
 28. Ozawa K, Kondo T, Hori O, Kitao Y, Stern DM, Eisenmenger W, Ogawa S, Ohshima T. Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest.* 2001;108:41–50.
 29. You D, Cochain C, Loinard C, Vilar J, Mees B, Duriez M, Levy BI, Silvestre JS. Hypertension impairs postnatal vasculogenesis: role of anti-hypertensive agents. *Hypertension.* 2008;51:1537–1544.
 30. Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science.* 2001;294:564–567.
 31. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol.* 2003;13:1070–1074.
 32. Jabs N, Franklin I, Brenner MB, Gromada J, Ferrara N, Wollheim CB, Lammert E. Reduced insulin secretion and content in VEGF-A deficient mouse pancreatic islets. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116(suppl 1):S46–S49.

CLINICAL PERSPECTIVE

Understanding the molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of vessel growth and maturation in the setting of tissue ischemia is of major importance and may trigger the development of innovative strategies of therapeutic angiogenesis in the treatment of ischemic diseases. In the present study, we analyzed the role of C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) in postischemic revascularization. CHOP-10 is a novel developmentally regulated nuclear protein that emerges as a critical transcriptional integrator among pathways regulating differentiation, proliferation, and survival. This study identifies CHOP-10 as a major modulator of vessel formation and maturation. The physiological significance of CHOP-10 in the vasculature is validated by the observation that ischemia and diabetes mellitus–induced oxidative stress upregulated CHOP-10 levels and that CHOP-10 deficiency markedly improved postischemic vessel growth in control animals but also in a pathological setting, such as diabetes mellitus. Finally, our data demonstrated that the transcriptional repression of endothelial nitric oxide synthase by CHOP-10 greatly contributes to the antiangiogenic effects of CHOP-10. In conclusion, this work suggests that CHOP-10 functions as an important regulator of postnatal neovascularization. Because downregulation of CHOP-10 promoted neovascularization, the regulation of CHOP-10 expression and activity may pave the way for new therapeutic strategies designed to increase vessel growth in the setting of ischemia. In contrast, forced expression or activation of CHOP-10 might limit unwanted neovascularization associated with tumor development or retinopathy.

Supplemental Material

A)



B)

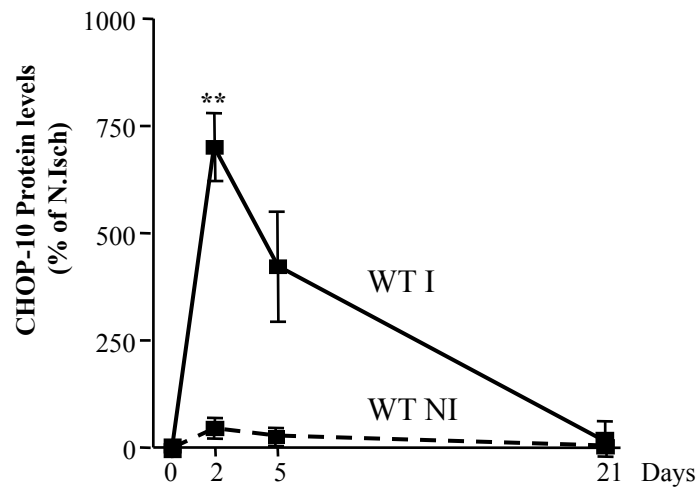


Figure 1. (A) Quantification of CHOP-10 mRNA (A) and protein (B) levels in the ischemic (WT I) and non ischemic (WT NI) adductor muscle of WT mice. Results were expressed as a percentage of non ischemic muscle at day 0. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus non ischemic muscle at day 0. $n = 8$ per group.

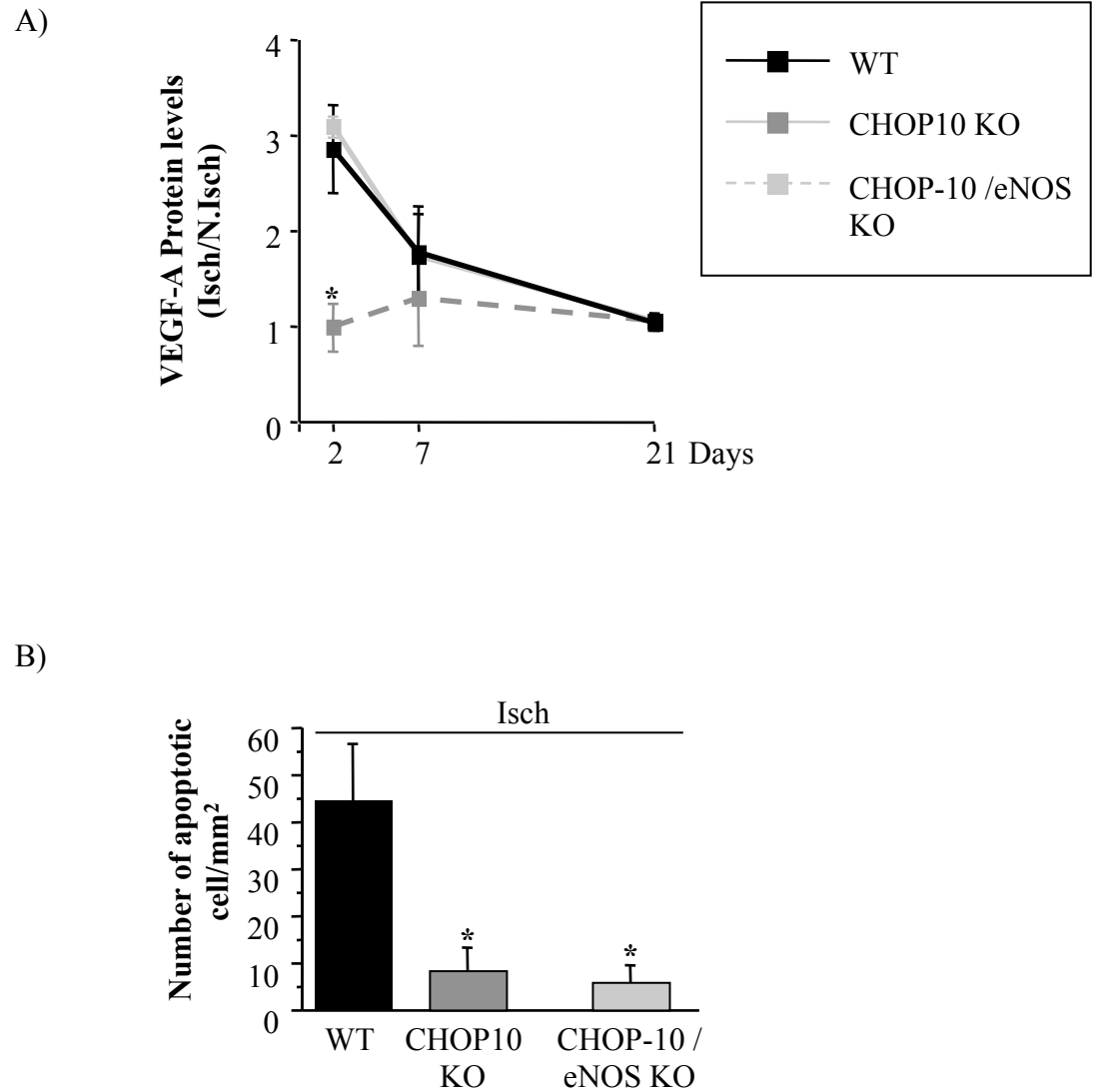


Figure 2. (A) Quantification of VEGF-A protein levels in calf muscle of WT, CHOP-10 KO and eNOS/CHOP-10 KO mice. Results were expressed as a ratio of ischemic to non-ischemic legs. * $p < 0.05$ versus wild-type mice. $n = 8$ per group. (B) Quantitative evaluation of the number of apoptotic cells in ischemic calf muscle of WT and CHOP-10 KO mice, 2 days after ischemia. 3 possible comparisons, for Bonferroni correction, $p < 0.016$ was considered significant. * $p < 0.016$ versus wild-type mice. $n = 8$ per group.

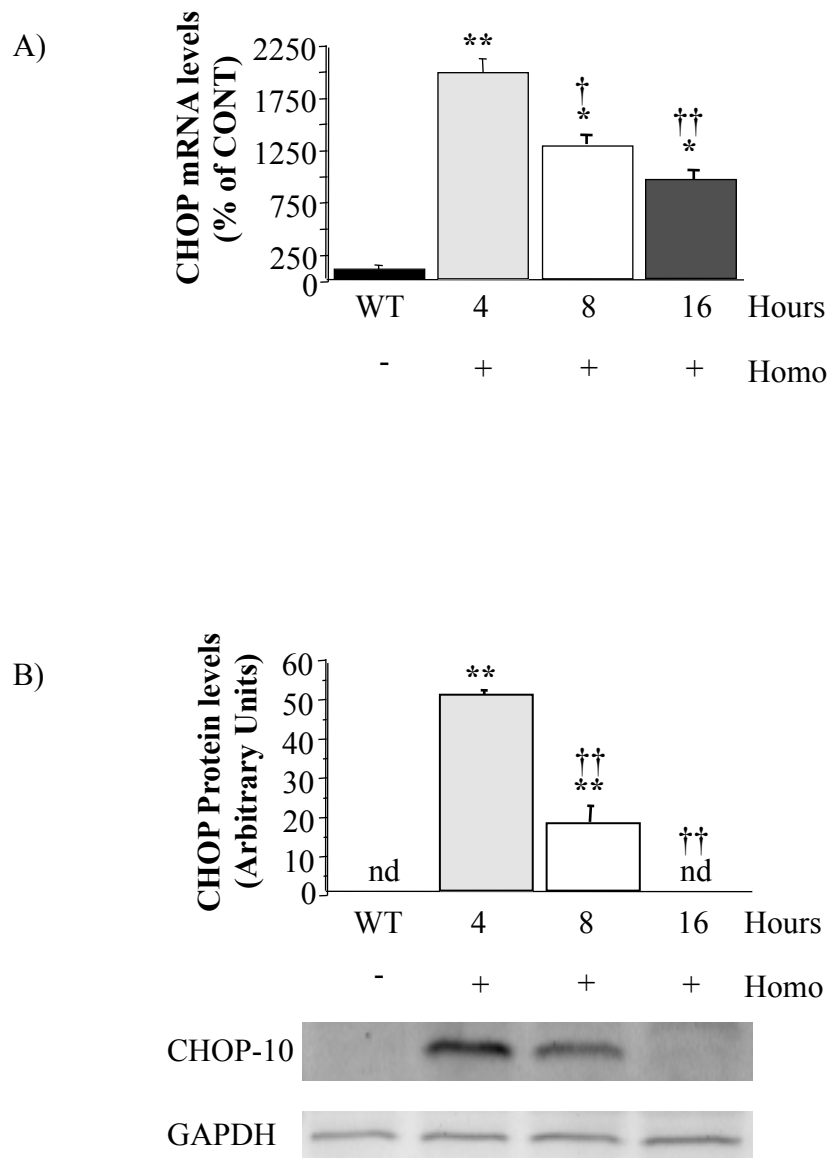


Figure 3. Quantification of mRNA (A) and protein (B) levels of CHOP-10 in cultured HUVEC treated with homocysteine (5nM) for 4, 8 or 16 hours. 6 possible comparisons, for Bonferroni correction, a value of $p < 0.008$ was considered significant. * $p < 0.008$, ** $p < 0.0016$ versus HUVEC wild-type; † $p < 0.008$, †† $p < 0.0016$ versus HUVEC 4 hours. $n = 10$ per group.

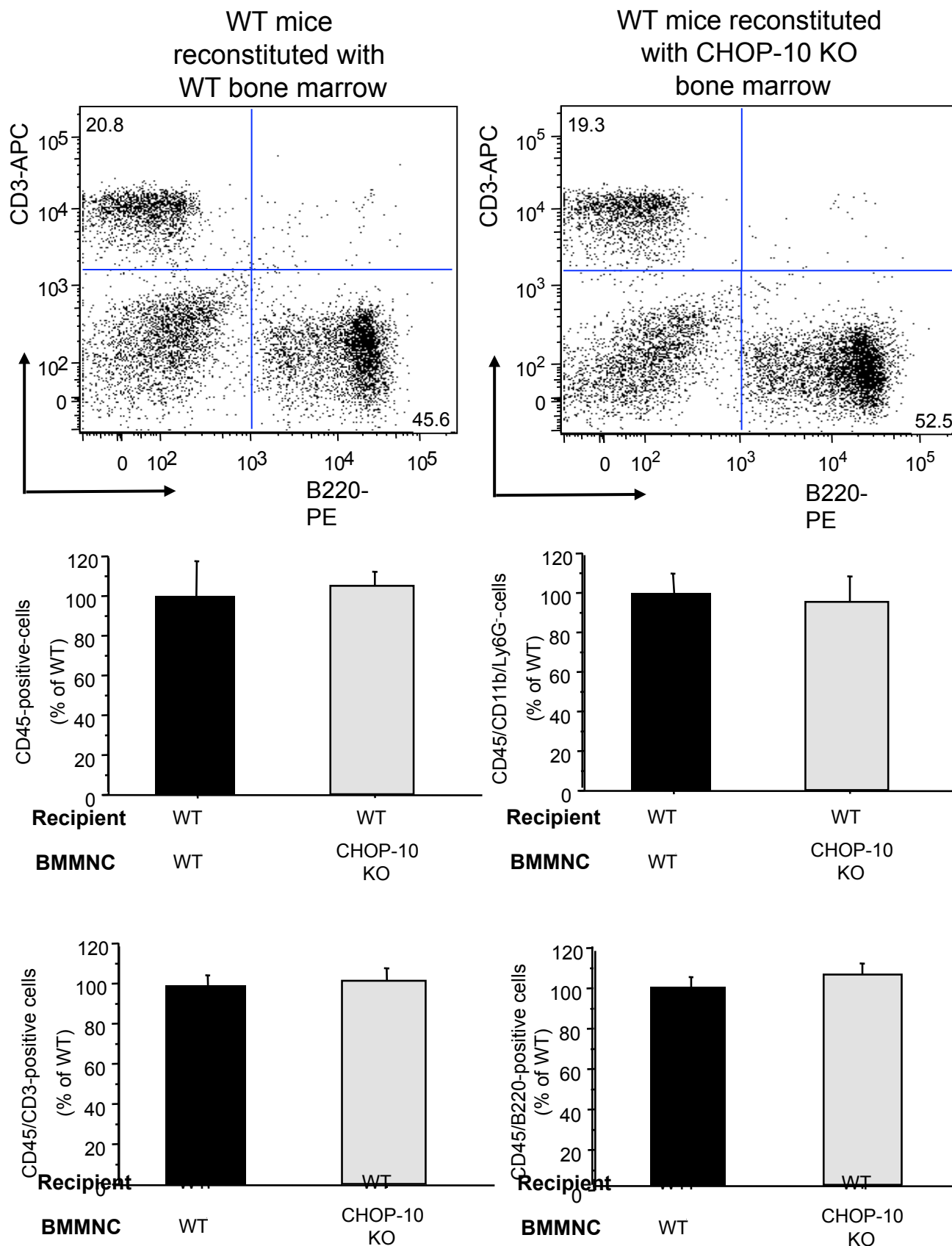
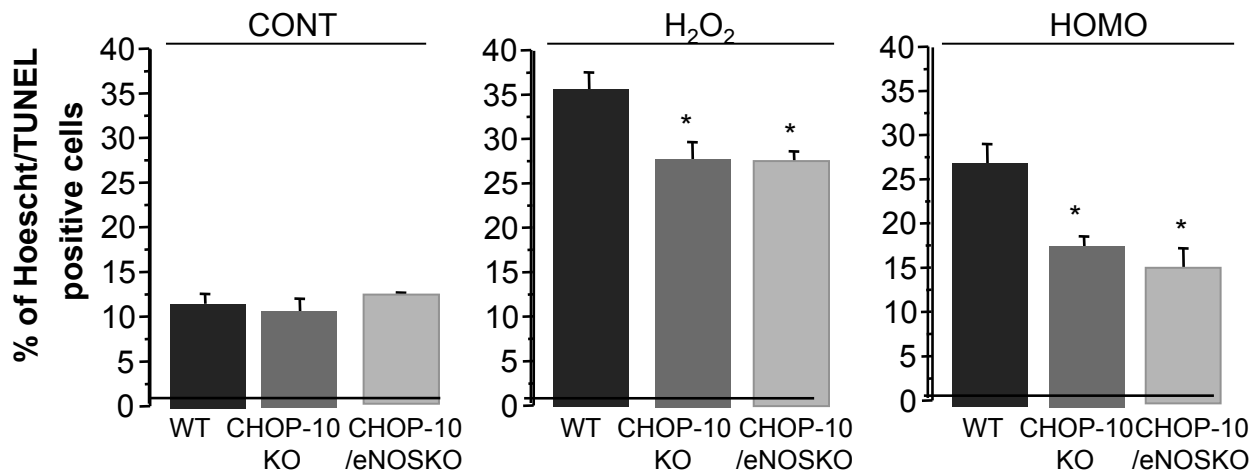


Figure 4. Wild-type mice were reconstituted with bone marrow from wild-type or CHOP-10 KO animals. 8 weeks after bone marrow transplantation, inflammatory cells number was evaluated in blood of mice without hindlimb ischemia. Upper, representative flow cytometry scattergraph, percentages were derived from cells positive for CD3 and B220. Lower, Quantitative analysis of the number of CD45 (total number of cells) ; CD45/CD11b⁺/Ly6G⁻ (monocytes) ; CD45/CD3⁺ (T lymphocytes) and CD45/B220⁺ (B Lymphocytes) in the blood of chimeric WT mice. n=5 per group.

A)



B)

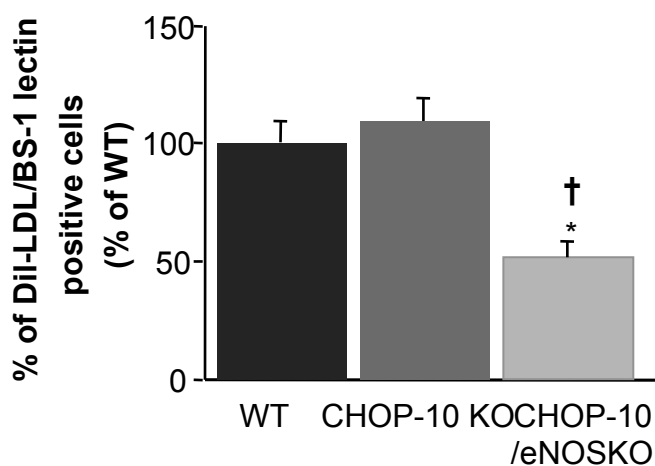


Figure 5 (A) Number of cultured BM-MNC positive for both Hoescht and TUNEL stainings after treatment with H₂O₂ or homocysteine (HOMO). BM-MNC were isolated from wild-type (WT), CHOP-10-deficient (CHOP-10 KO) or eNOS/CHOP-10 double deficient mice. (B) Quantification of AcLDL-Dil and BS-1 lectin-positive cells derived from WT, CHOP-10 KO and eNOS/CHOP-10 double KO BM-MNC. Data are presented as mean \pm SEM. 3 possible comparisons, for Bonferroni correction, $p < 0.016$ was considered significant. * $p < 0.016$ versus WT BM-MNC; † $p < 0.016$ versus CHOP-10 KO BM-MNC. $n = 7$ per group.

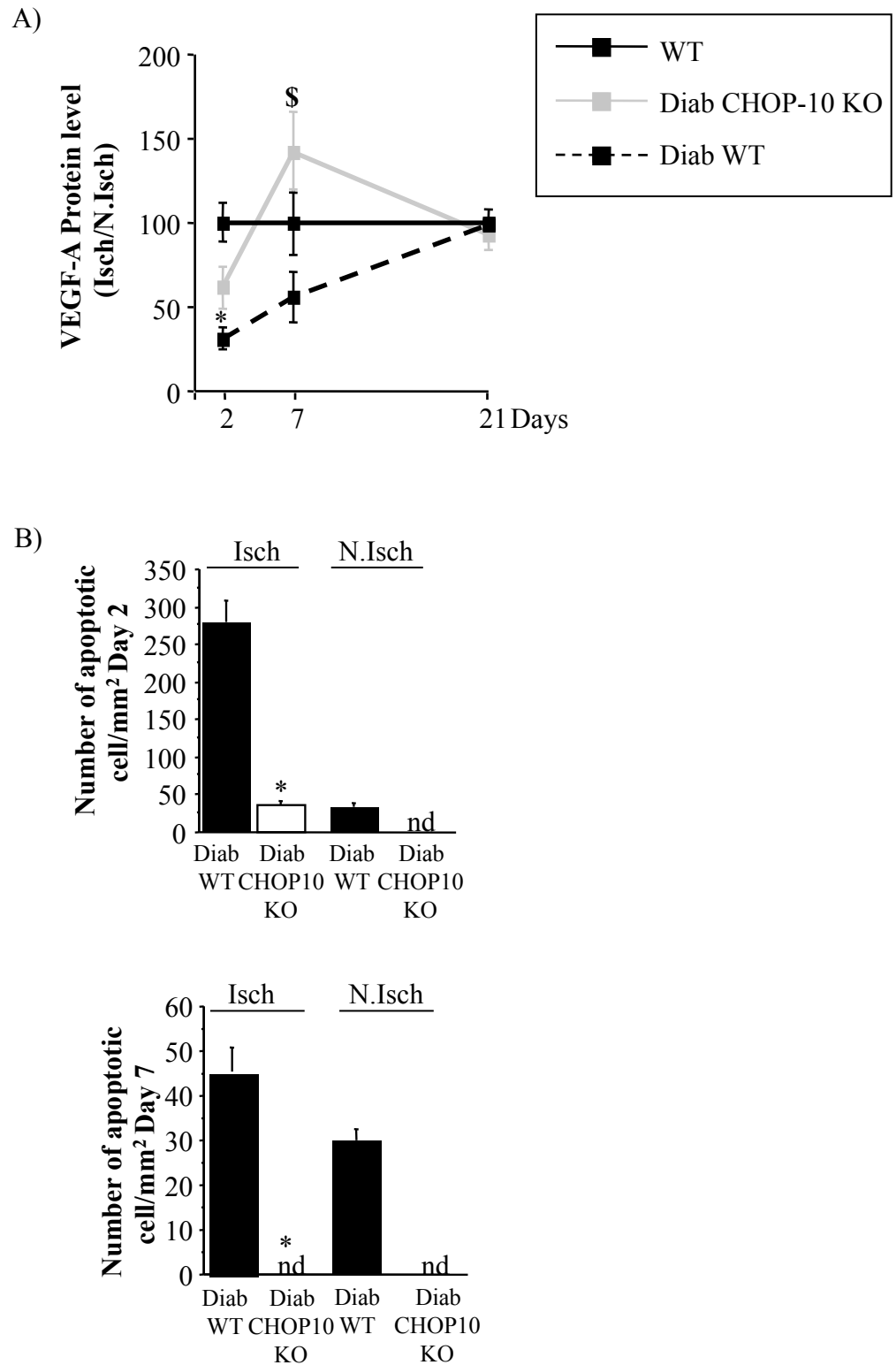
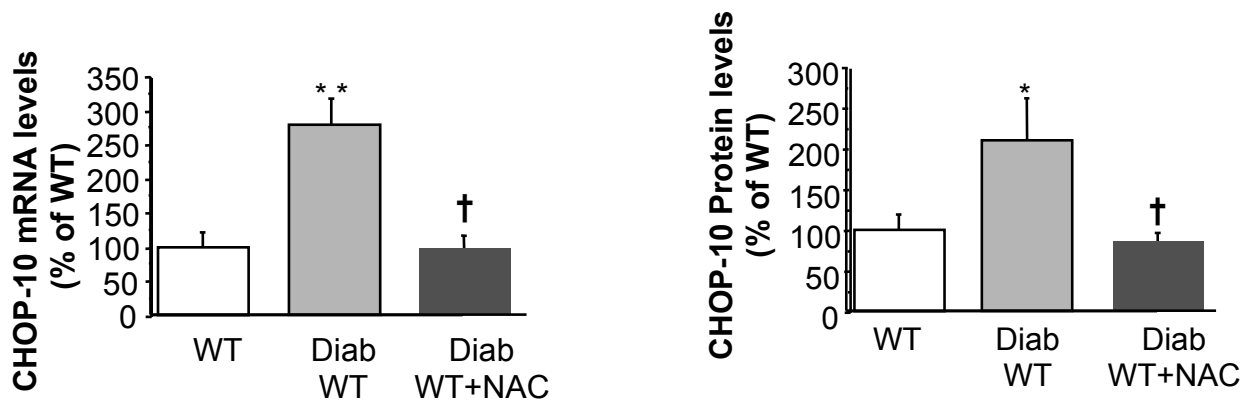


Figure 6. (A) Quantification of VEGF-A protein levels in calf muscle of wild-type (WT), diabetic WT (Diab WT) and diabetic CHOP-10 KO (Diab CHOP-10 KO) mice. Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus WT, \$ $p < 0.05$ versus Diab WT. (B) Quantitative evaluation of the number of apoptotic cells in ischemic calf muscle and in calf muscle of diabetic WT (Diab WT) and diabetic CHOP-10 KO (Diab CHOP-10KO) mice, 2 and 7 days after ischemia. Nd indicates not detected. Data are presented as mean \pm SEM. 6 possible comparisons, for Bonferroni correction, a value of $p < 0.008$ was considered significant. * $p < 0.008$ versus diabetic wild-type mice. $n = 8$ per group.

A)



B)

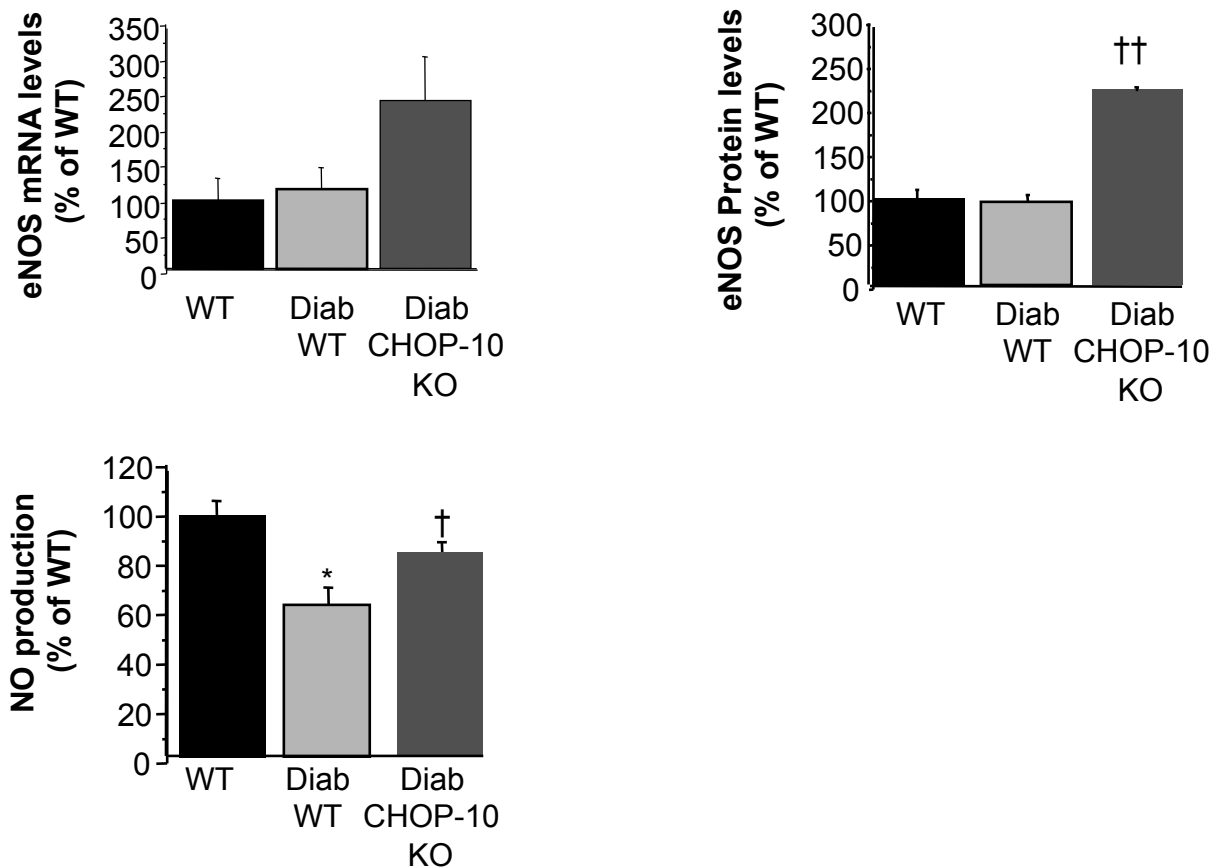


Figure 7. (A) Quantification of CHOP-10 mRNA and protein levels in BM-MNC of wild-type (WT), diabetic WT (Diab WT) and diabetic CHOP-10 KO mice (Diab CHOP-10KO). (B) Quantification of eNOS mRNA and protein levels and NO production in BM-MNC of wild-type (WT), diabetic WT (Diab WT) and diabetic CHOP-10 KO mice (Diab CHOP-10KO). Data are presented as mean \pm SEM. 3 possible comparisons, for Bonferroni correction, a value of $p < 0.016$ was considered significant * $p < 0.016$, ** $p < 0.002$ versus WT; † $p < 0.016$, †† $p < 0.002$ versus diabetic WT. $n = 7$.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

The Chemokine Decoy Receptor D6 Prevents Excessive Inflammation and Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction

Clément Cochain, Constance Auvynet, Lucie Poupel, José Vilar, Edouard Dumeau, Adèle Richart, Alice Récalde, Yasmine Zouggari, Kiave Yune Ho Wang Yin, Patrick Bruneval, Gilles Renault, Carmen Marchiol, Philippe Bonnin, Bernard Lévy, Raffaella Bonecchi, Massimo Locati, Christophe Combadière and Jean-Sébastien Silvestre

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32:2206-2213; originally published online July 12, 2012;
doi: 10.1161/ATVBAHA.112.254409

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272
Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/32/9/2206>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2012/07/12/ATVBAHA.112.254409.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

The Chemokine Decoy Receptor D6 Prevents Excessive Inflammation and Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction

Clément Cochain, Constance Auvynet, Lucie Poupel, José Vilar, Edouard Dumeau, Adèle Richart, Alice Récalde, Yasmine Zougari, Kiave Yune Ho Wang Yin, Patrick Bruneval, Gilles Renault, Carmen Marchiol, Philippe Bonnin, Bernard Lévy, Raffaella Bonecchi, Massimo Locati, Christophe Combadière,* Jean-Sébastien Silvestre*

Objective—Leukocyte infiltration in ischemic areas is a hallmark of myocardial infarction, and overwhelming infiltration of innate immune cells has been shown to promote adverse remodeling and cardiac rupture. Recruitment of inflammatory cells in the ischemic heart depends highly on the family of CC-chemokines and their receptors. Here, we hypothesized that the chemokine decoy receptor D6, which specifically binds and scavenges inflammatory CC-chemokines, might limit inflammation and adverse cardiac remodeling after infarction.

Methods and Results—D6 was expressed in human and murine infarcted myocardium. In a murine model of myocardial infarction, D6 deficiency led to increased chemokine (C-C motif) ligand 2 and chemokine (C-C motif) ligand 3 levels in the ischemic heart. D6-deficient (D6^{-/-}) infarcts displayed increased infiltration of pathogenic neutrophils and Ly6Chi monocytes, associated with strong matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 activities in the ischemic heart. D6^{-/-} mice were cardiac rupture prone after myocardial infarction, and functional analysis revealed that D6^{-/-} hearts had features of adverse remodeling with left ventricle dilation and reduced ejection fraction. Bone marrow chimera experiments showed that leukocyte-borne D6 had no role in this setting, and that leukocyte-specific chemokine (C-C motif) receptor 2 deficiency rescued the adverse phenotype observed in D6^{-/-} mice.

Conclusion—We show for the first time that the chemokine decoy receptor D6 limits CC-chemokine-dependent pathogenic inflammation and is required for adequate cardiac remodeling after myocardial infarction. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2206-2213.)

Key Words: chemokines ■ immune system ■ inflammation ■ ischemic heart disease ■ leukocytes

The inflammatory response that develops in the ischemic heart after myocardial infarction (MI) is a major determinant of left ventricle (LV) remodeling.¹ In mice, several leukocyte subsets infiltrate the ischemic heart: neutrophils massively infiltrate the myocardium within the first 24 hours and rapidly fade thereafter. Infiltration of the 2 monocytes subsets, Ly6Chi and Ly6Clo, is biphasic; Ly6Chi monocytes dominate the acute phase of injury during the first 4 days, whereas Ly6Clo monocytes are prevalent thereafter.² Ly6Chi monocytes scavenge necrotic debris and control the early events of postinfarct remodeling through the combination of inflammatory mediator expression, phagocytosis, and proteolysis. Of note, serine proteases secreted by monocytes and

neutrophils promote LV dilation and cardiac rupture.³ In this line, Ly6Chi monocytosis in apolipoprotein E^{-/-} (ApoE^{-/-}) mice has been shown to be associated with high proteolytic activity in the myocardium and adverse LV remodeling after MI.⁴ In contrast, Ly6Clo monocytes are thought to have a pro-healing phenotype and promote vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis.²

Hence, the inflammatory response appears as a double-edged sword because it is a protective attempt by the organism to initiate the healing process; however, inflammation itself can exacerbate scarring and loss of organ function. In this view, the successful resolution of inflammation appears as a key event in the repair of tissue damage, but little is known

Received on: February 9, 2012; final version accepted on: June 27, 2012.

From the Université Paris Descartes, INSERM UMR-S970, Paris Cardiovascular Research Center, Hôpital Européen Georges Pompidou (C. Cochain, J.V., E.D., A. Richart, A. Récalde, Y.Z., K.Y.H.W.Y., B.L., J.-S.S.); Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Université Paris 06, INSERM UMR-S945, Laboratoire Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière (C.A., L.P., C. Combadière); Service d'anatomie pathologique, Hôpital Européen Georges Pompidou (P. Bruneval); Plate Forme d'imagerie du Petit Animal, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, (G.R., C.M.); Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Denis Diderot, (P. Bonnin) Paris, France; Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan (R.B., M.L.), Milan, Italy; and Humanitas Clinical and Research Center (R.B., M.L.), Milan, Italy.

*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.112.254409/-/DC1>.

Correspondence to Jean-Sébastien Silvestre, PhD, Paris Cardiovascular Research Center, INSERM U970, Université Paris Descartes, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France. E-mail jean-sebastien.silvestre@inserm.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.254409

about the main mediators of this process in the infarcted cardiac tissue.

Leukocyte recruitment to the infarcted heart depends highly on chemokines of the CC-chemokine family. The chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)/chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2) axis controls Ly6Chi monocyte infiltration in the infarcted myocardium, and several studies using genetic or pharmacological approaches have shown that disruption of CCL2/CCR2 signaling alleviates adverse LV remodeling after MI through the inhibition of inflammatory cell recruitment.⁵⁻⁷ In addition, expression of other CC-chemokines in the ischemic heart, such as CCL5 or CCL3,⁸ has been associated with excessive inflammation and poor LV remodeling.

Although extensive knowledge regarding the initiation of the inflammatory response after MI has been acquired over the past few years, little is known concerning endogenous mechanisms able to limit those inflammatory processes and the associated adverse tissue remodeling leading to loss of organ function. Here, we hypothesized that the chemokine decoy receptor D6 could limit post-MI inflammation through the control of CC-chemokine levels. Indeed, D6 possesses the unique ability to specifically bind and internalize inflammatory CC-chemokines⁹ without triggering conventional cell activation or chemotaxis, and has been shown to limit in vivo inflammatory responses in settings of skin inflammation, cancer,¹⁰ *Mycobacterium tuberculosis* infection,¹¹ and intestinal inflammation.¹² Recently, D6 has also been shown to prevent lymphatic congestion, and D6 deficiency is associated with poor lymphatic drainage of inflamed tissues.¹³

Here, we show that D6 is expressed in human and murine infarcted myocardium and controls levels of CC-chemokines after MI. D6 deficiency was associated with increased pathogenic inflammation, cardiac rupture, and adverse LV remodeling after MI.

Materials and Methods

Immunohistochemistry on Human Samples

Apical ischemic myocardial tissue was removed through a normal surgical procedure for the implantation of LV-assist devices in 6 patients presenting cardiogenic shock attributable to acute MI (1–7 days). The clinical course of these patients was previously described and published.¹⁴ The tissues were submitted to surgical pathology diagnosis as previously reported.¹⁴ The remnant tissues in paraffin blocks were used for research purpose with informed consent of the patients. The samples consisted of chips of left myocardium measuring 0.5 to 2 cm of long axis and were samples of cardiac apical LVs removed for implantation of a LV-assist device. The selected cases were acute MI lasting for 24 to 48 hours and presenting with acute cardiac failure. In these samples, some areas showed figures of remote MI with scarring. In paraffin sections, antigen retrieval was obtained with citrate buffer in a microwave oven (3×4 minutes at 400W). The anti-D6 polyclonal antibody (Thermo Scientific, Rockford, IL) was diluted at 1/300 and revealed with a 3-step technique using ABC peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Negative controls consisted of incubation of sections with a nonrelevant goat polyclonal antibody, anti-nephrin C-17 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA). Endothelial cells were stained with anti-CD31 antibody (Dako, Trappes, France; 1/20), macrophages with anti-CD68 antibody (Dako; 1/50), and lymphatic endothelial cells with D2.40 (podoplanin) antibody (Dako; 1/100).

Mice

Eight- to 12-week-old male mice were used. D6-deficient (D6^{-/-}) mice were on a C57BL6/J background as previously described.¹¹ CCR2-deficient (CCR2^{-/-}) mice were from Jackson Laboratories. Age-matched C57BL6/J mice were used as wild-type (WT) controls. For bone marrow (BM) chimeras generation, WT mice were irradiated with a total dose of 9.5 Gy and received an intravenous injection of 10⁷ total BM cells retrieved from WT, CCR2^{-/-}, or D6^{-/-} donors the next day. All the experiments were performed in accordance with the European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (No. 07430).

RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from the infarcted area and its border zone with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Paris, France). DNA synthesis was performed with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Polymerase chain reaction was performed on an ABI Prizm 7700 with the use of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Mouse GAPDH was used to normalize sample amplification. The following oligonucleotides (Applied Biosystems) served as primers: GAPDH forward: 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3'; reverse: 5'-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3'; D6 forward: 5'-GCAATCCGCAGCTAACAGTTAAG-3'; reverse: 5'-CAAGCCCAGCACGAAGATCAG-3'.

Myocardial Infarction

Mice were anesthetized with ketamine and xylazine and placed under mechanical ventilation. Left thoracotomy was performed to expose the LV of the heart. The left anterior descending coronary artery was visualized and ligated just below the left auricular level with a 7/0 nylon suture. Mechanical ventilation was maintained until mice awakening, and mice were then allowed to recover for 1 hour on a heating pad.

Echography

Before ischemic injury, M-mode echocardiography was performed by a blinded investigator. On infarcted mice, B-mode echocardiography was performed by blinded investigators at the Small Animal Imaging Unit (Plateforme d'imagerie du petit animal, Hôpital Cochin, Université Paris 5).

Flow Cytometry

The infarcted area and its border zone were isolated from WT and D6^{-/-} hearts, minced and digested in 450-U/mL collagenase I, 125-U/mL collagenase XI, 60-U/mL hyaluronidase, and 60-U/mL DNase for 1 hour, before gradient density centrifugation on histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Infiltrating cells were stained with monoclonal rat anti-mouse CD45-allophycocyanin, CD11b-PerCPCy5.5 (clone M1/70), Ly6G-phycoerythrin (clone 1A8), natural killer 1.1-phycoerythrin (all from BD Biosciences, San Jose, CA), and 7/4-fluorescein isothiocyanate (Abd Serotec, Colmar, France) and analyzed on a BD LSR II flow cytometer.

Chemokine Protein Levels and Zymography

Infarcts from WT and D6^{-/-} mice were snap frozen in liquid nitrogen and homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer. The protein content of the samples was determined using a Lowry assay (BioRad). Total protein extracts (50 µg) were loaded onto CCL2, CCL3, CCL5, and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) to determine chemokine levels. For gelatin zymography, 10 µg of total MI protein extracts were loaded onto a 9% acrylamide gel containing 0.1% gelatin. After protein migration, gels were incubated overnight in a calcium-containing buffer and gelatinase activity was revealed by Coomassie Blue staining.

Histology and Immunohistochemistry

Infarcts from WT or D6^{-/-} mice were snap frozen in liquid nitrogen. All stainings were performed on 7-μm cryostats slides. Masson Trichrome staining was performed according to standard procedures. Caveolin-1 immunostaining was performed using polyclonal rabbit anti-mouse caveolin-1 antibody (1/100; Santa Cruz) followed by Texas Red conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (Jackson Immunochemistry, Suffolk, UK). Neutrophils and 7/4⁺ cells were stained with phycoerythrin-conjugated monoclonal rat anti-mouse Ly6G antibody (1/100; clone 1A8; BD Biosciences) and fluorescein isothiocyanate-conjugated 7/4 antibody (1/100; AbD Serotec).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean±SEM. Values were compared with a Mann–Whitney *U* test, and *P*<0.05 was considered significant. Kaplan–Meier analysis was used to compare survival after MI.

Results

D6 Is Expressed in Human Infarcted Myocardium

We first analyzed D6 expression by immunohistochemistry in biopsies from human MI patients. Although D6 expression was not detected in remote, viable myocardium (Figure 1A), we observed strong D6 signal in necrotic and inflammatory areas on infiltrating leukocytes and vascular structures (Figure 1B and 1C). Further staining of serial MI sections showed D6 expression on CD31⁺ endothelial cells, CD68⁺ macrophages,

and D2-40⁺ (podoplanin⁺) lymphatic endothelial cells (Figure 1D). These results show that D6 appears to be preferentially expressed in the ischemic human heart on cells of vascular endothelial, lymphatic, and macrophage lineages.

D6 Is Expressed in Murine MI and Controls CCL2 and CCL3 Levels

We then analyzed D6 mRNA expression in murine myocardium. D6 was expressed in normal mouse heart, although its mRNA levels were much lower than in positive control tissues such as lung and spleen¹¹ (Figure 2A; heart versus spleen *P*=0.08; heart versus lung *P*<0.001). Interestingly, D6 mRNA levels were upregulated by 2.0-, 2.5-, and 2.5-fold at 5, 7, and 14 days after coronary artery ligation, respectively (*P*<0.01; Figure 2B).

To analyze the role of D6 in the control of CC-chemokine levels after MI, we measured CCL2 and CCL3 protein levels in WT and D6^{-/-} hearts before as well as 1, 3, and 5 days after infarction. Although barely detectable in nonischemic WT or D6^{-/-} hearts, CCL2 levels raised drastically and to a similar extent in WT and D6^{-/-} hearts at 1 day after MI, indicating that the initial CCL2 burst is not altered in D6^{-/-} hearts. At day 3, we observed a slight but significant increase in CCL2 levels in D6^{-/-} hearts (*P*<0.05 versus WT). Most importantly, while CCL2 decreased between day 3 and day

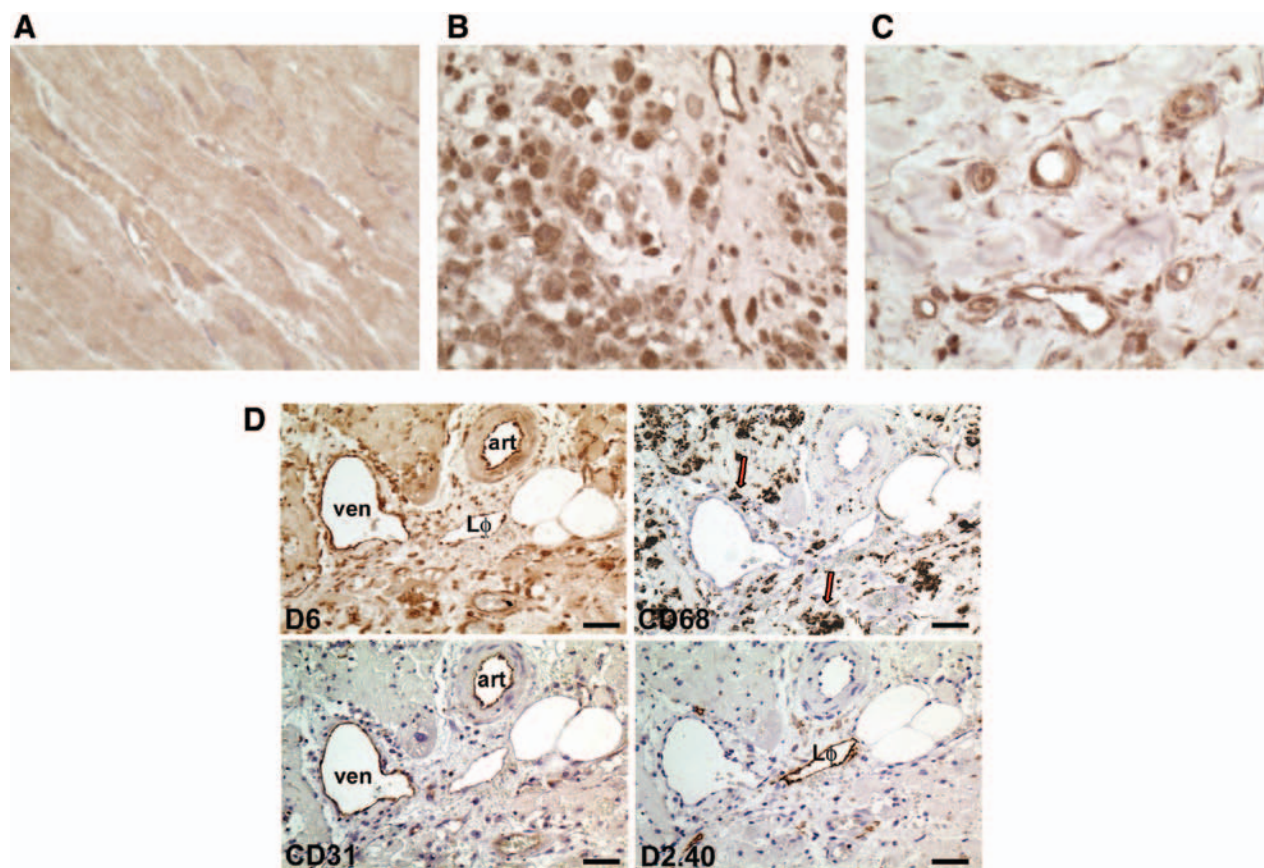


Figure 1. D6 expression in infarcted human myocardium. D6 immunostaining of human myocardial infarction (MI) tissue obtained during left ventricular assist device implantation in patients with recent MI (1–7 days). **A**, D6 immunostaining in adjacent, viable myocardium (×400). **B** and **C**, D6 immunostaining in necrotic MI areas (×400). **D**, D6 (top left), CD68 (top right, arrows), CD31 (bottom left), and D2.40 (podoplanin, bottom right) immunostainings on serial MI sections (×200). Ven indicates venule; art, artery; Lφ, lymphatic vessel. Scale bar=30 μm.

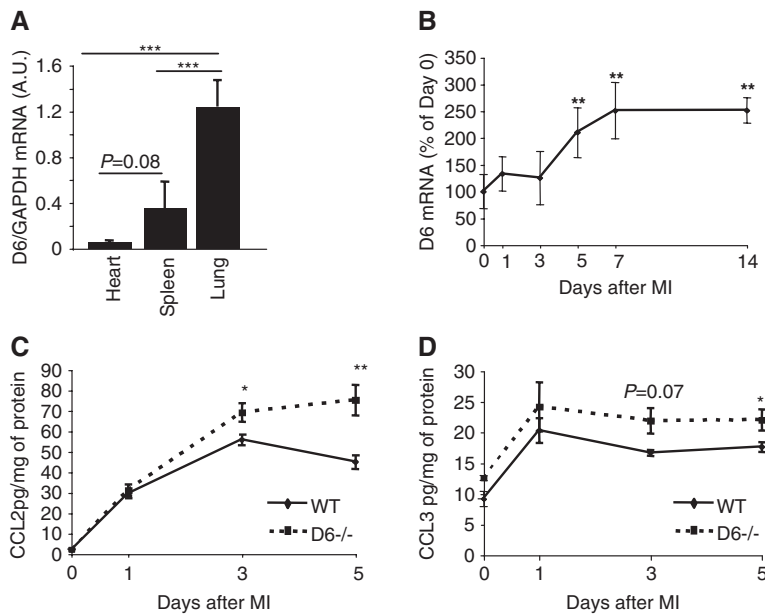


Figure 2. D6 and chemokine expression in murine infarcted myocardium. **A**, D6 mRNA levels, normalized to GAPDH mRNA, in normal murine heart, spleen, and lung, *** $P < 0.001$ ($n = 5$ per organ tested). **B**, D6 mRNA, in % of day 0 (no myocardial infarction [MI]) levels, in murine infarcted myocardium, ** $P < 0.01$ vs day 0 ($n = 3$ –5 per time point). **C**, Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and **D**, CCL3 protein levels in wild-type (WT) and D6^{-/-} hearts before and 1, 3, and 5 days after MI. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs WT ($n = 3$ –7 per group at each time point).

5 in WT hearts, CCL2 levels were maintained in D6^{-/-} hearts ($P < 0.01$ versus WT), indicating a defect in CCL2 clearance in D6^{-/-} hearts after MI (Figure 2C). We also observed a similar increase in CCL3 levels at 1 day after MI in WT and D6^{-/-} hearts. CCL3 levels tended to remain higher at 3 days in D6^{-/-} mice, although it did not reach statistical significance ($P = 0.07$ versus WT). Of note, at 5 days, CCL3 levels were significantly increased in D6^{-/-} hearts ($P < 0.05$ versus WT; Figure 2D). Surprisingly, CCL5 levels were not affected by D6 deficiency (Figure I in the online-only Data Supplement). Consistent with the specificity of D6 for inflammatory CC-chemokines, chemokine (C-X-C motif) ligand 2 levels were identical in WT and D6^{-/-} hearts (Figure I in the online-only Data Supplement). Altogether, our human and murine data show that D6 expression is increased after MI, and that D6 deficiency in mice is associated with a defective clearance of specific CC-chemokines after MI, with a particularly marked effect on CCL2 levels.

Increased Inflammation in D6^{-/-} Hearts After MI

At 5 days after MI, we collected infarcted hearts from D6^{-/-} and WT mice and analyzed the inflammatory infiltrate by flow cytometry. In D6^{-/-} hearts, infiltration of 7/4hi monocytes (equivalent to Ly6Chi monocytes)¹⁵ and Ly6G⁺ neutrophils was increased by 2.7- and 3.8-fold, respectively ($P < 0.05$; Figure 3A and 3B), whereas 7/4lo monocyte (equivalent to Ly6Clo monocytes)¹⁵ levels were similar to those found in WT (Figure 3B). These results were further confirmed by immunofluorescence analysis of Ly6G⁺ and 7/4⁺ cell density in WT or D6^{-/-} MI sections (Figure 3C and 3D). A similar infiltration pattern was observed at 7 days after MI: 7/4hi monocytes and neutrophil infiltration was still substantial in D6^{-/-} MIs, whereas those leukocyte subsets had almost completely vanished from WT MIs. 7/4lo monocyte levels remained unchanged (Figure II in the online-only Data Supplement). Neutrophils and inflammatory monocytes are a predominant source of proteases in the infarcted heart. We

measured matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in 5-day-old WT or D6^{-/-} MI by gelatin zymography and found strong increases of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in D6^{-/-} hearts at 5 days after MI (2.3- and 2.1-fold versus WT levels, respectively; $P < 0.05$; Figure 3C and 3D). Altogether, those data show that D6 deficiency leads to exacerbated infiltration of pathogenic Ly6Chi monocytes and neutrophils after MI, associated with high proteolytic activity in the ischemic heart.

Cardiac Rupture and Adverse LV Remodeling in D6^{-/-} Mice After MI

We then analyzed the survival of D6^{-/-} mice over a period of 14 days and assessed their cardiac function by echocardiography. Although mortality was low in infarcted WT mice, >40% of D6^{-/-} mice had died by day 10 (Figure 4A; $P < 0.05$). This increase in mortality was attributable to a high incidence of cardiac rupture in D6^{-/-} mice (45% versus 16.6% in WT; $P < 0.05$; Figure 4B). Although baseline cardiac function was identical in D6^{-/-} and WT mice (Figure III in the online-only Data Supplement), echocardiography revealed features of adverse LV remodeling in surviving D6^{-/-} mice at 14 days after MI: LV end-systolic and end-diastolic endocardial volumes were increased by 1.5- and 1.3-fold, respectively ($P < 0.01$; Figures 4C and 3D), indicating substantial LV dilation, and ejection fraction was decreased by 36% in D6^{-/-} hearts ($P < 0.05$; Figure 4E; Figure III in the online-only Data Supplement). Further echocardiographic parameters such as average LV wall thickness and fractional area contraction also tended to be altered in D6^{-/-} mice (Figure III in the online-only Data Supplement). Histological measures showed that D6^{-/-} infarcts were 20% larger ($P < 0.05$; Figure 4F). These data show that D6 deficiency leads to increased incidence of cardiac rupture and adverse LV remodeling in surviving mice. Increased LV dilation and poor LV contractility occurred despite higher angiogenesis, as the capillary density in the

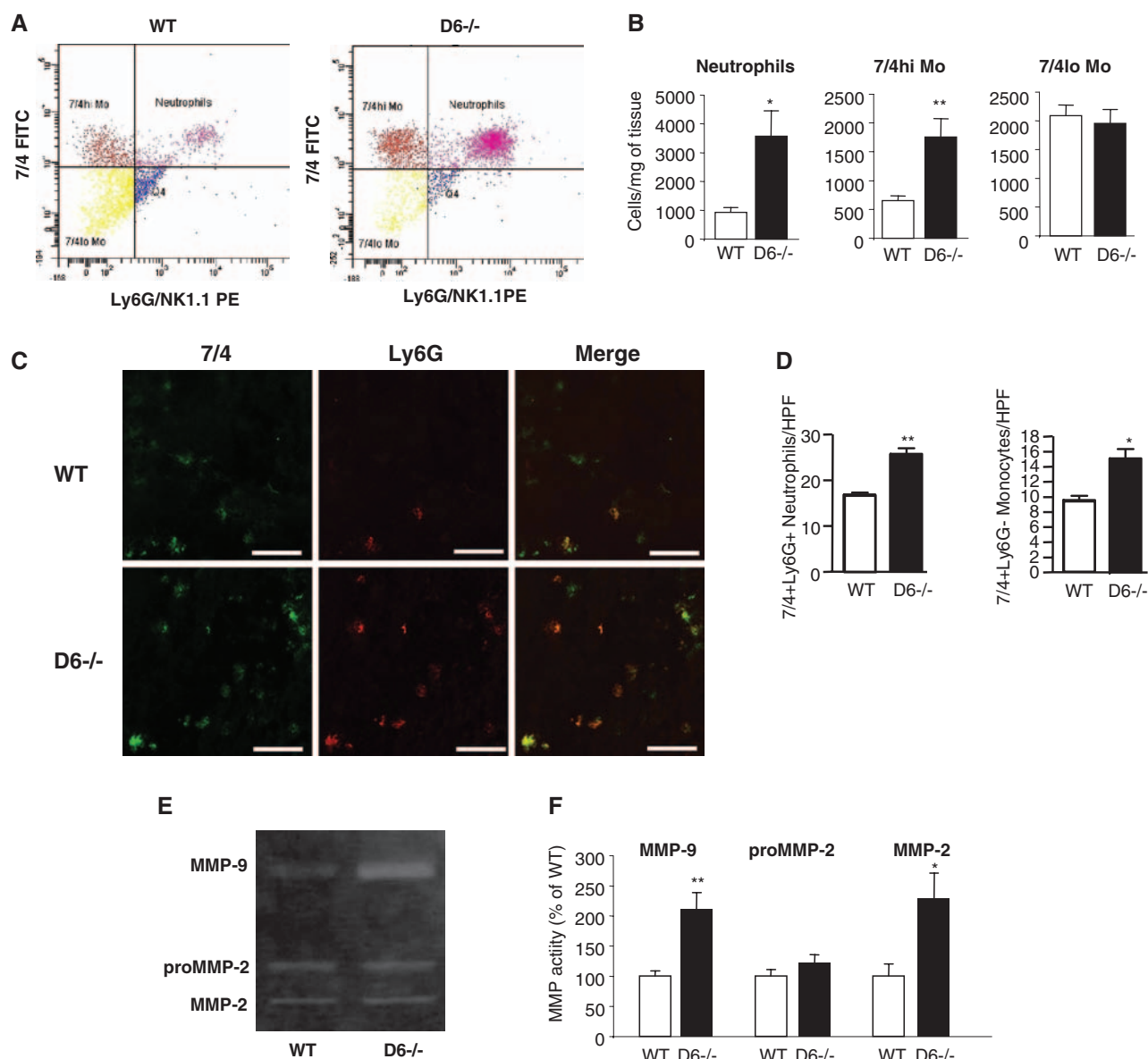


Figure 3. Increased inflammation in D6^{-/-} hearts after myocardial infarction (MI). **A**, Representative fluorescence-activated cell sorting dot plots obtained from wild-type (WT) and D6^{-/-} digested hearts at 5 days after MI. Cells were gated on CD11b-expressing leukocytes. **B**, Quantitative evaluation of neutrophils, 7/4hi monocytes, and 7/4lo monocytes infiltration in WT and D6^{-/-} hearts at 5 days after MI. ***P*<0.01, **P*<0.05 (*n*=6 per group). **C**, 7/4 (green) and Ly6G (red) immunostainings and **(D)** quantitative analysis of 7/4+Ly6G⁺ neutrophils and 7/4+Ly6G⁻ monocytes per high power field (HPF) on day 5 WT and D6^{-/-} MI cryosections, ×200 magnification, scale bar=10 μm. ***P*<0.01, **P*<0.05. **E**, Representative zymogram and **(F)** quantitative analysis of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and MMP-2 activity in WT and D6^{-/-} hearts at 5 days after MI. **P*<0.05, ***P*<0.01 (*n*=10 per group). FITC indicates fluorescein isothiocyanate; NK, natural killer; PE, phycoerythrin.

border zone of D6^{-/-} MI was slightly increased (Figure IV in the online-only Data Supplement).

Adverse Remodeling in D6^{-/-} Mice Depends on CCR2 Signaling

We observed substantial D6 expression on leukocytes, including CD68⁺ macrophages, infiltrating human MI (Figure 1). To assess the putative role of D6 expressed by leukocytes, we generated BM chimeras by reconstituting lethally irradiated WT mice with D6^{-/-} BM. Mice with leukocyte-specific D6 deficiency did not show any significant mortality after MI (data not shown) and had LV end-diastolic, LV end-systolic, and

LV ejection fraction identical to controls (irradiated WT mice reconstituted with WT BM; Figure 5A, 5B, and 5C; Figure III in the online-only Data Supplement). Nevertheless, those mice displayed a slight increase in neutrophil infiltration at day 7, although it did not reach statistical significance (Figure V in the online-only Data Supplement). These data suggest that although leukocyte born D6 might have an accessory role, it is clearly compensated by nonleukocyte D6 expression, at least in our model. To confirm the role of CC-chemokines, and most particularly that of CCL2, which local and systemic levels were preferentially enhanced by D6 deficiency, lethally irradiated D6^{-/-} mice were reconstituted with WT or

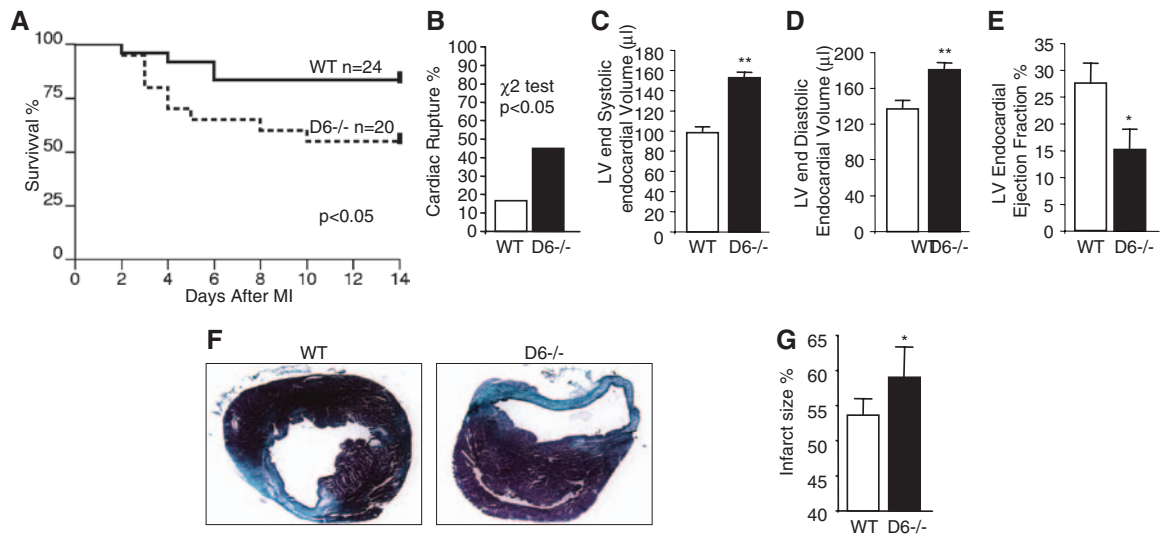


Figure 4. Cardiac rupture and adverse left ventricular (LV) remodeling in D6^{-/-} mice after myocardial infarction (MI). **A**, Survival of wild-type (WT) vs D6^{-/-} mice after MI. **B**, Percentage of cardiac rupture occurrence in WT vs D6^{-/-} mice over 14 days. **C**, LV end-systolic endocardial volume (μL), **D** LV end-systolic endocardial volume (μL), and **E** endocardial ejection fraction (%) in WT vs D6^{-/-} mice at 14 days after MI. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **F**, Representative photographs of Masson Trichrome stainings and **G** quantitative analysis of infarct size in WT and D6^{-/-} infarcts at 14 days after MI. * $P < 0.05$ (n=7 WT; 6 D6^{-/-}).

CCR2^{-/-} BM. At 14 days after MI, D6^{-/-} mice reconstituted with WT BM displayed LV dilation and reduced ejection fraction (Figure 5D, 5E, and 5F; Figure III in the online-only Data Supplement), further suggesting that leukocyte-borne D6 has no clear role in this setting. Most interestingly, leukocyte-specific CCR2 deficiency completely rescued the phenotype of D6^{-/-} mice, because D6^{-/-} mice reconstituted with CCR2^{-/-} BM displayed no significant LV dilation and had ejection fraction similar to controls (Figure 3D, 3E, and 3F; Figure III in the online-only Data Supplement). These data strongly suggest that leukocyte-borne D6 has no major role

in the inflammatory response after MI, and that the adverse remodeling phenotype in D6^{-/-} mice depends on CCL2/CCR2 signaling.

Discussion

Here, we have shown for the first time that CC-chemokine, and most particularly CCL2-scavenging by the decoy receptor D6, prevented excessive inflammation in the ischemic heart and limited the extent of myocardial damage caused by an overwhelming immune response. We propose a model where ischemia induces CC-chemokines in the ischemic

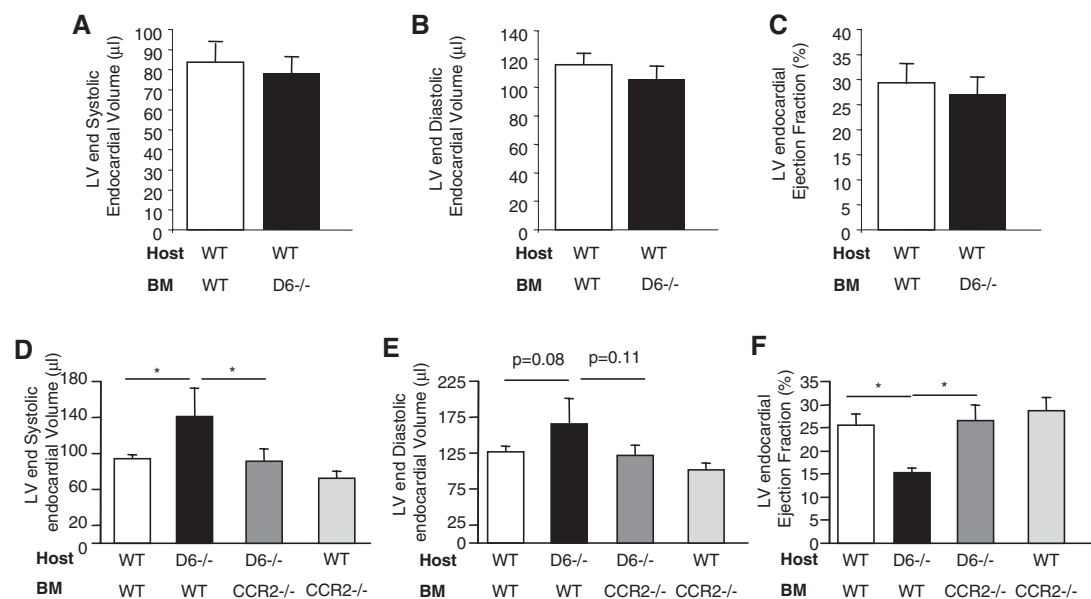


Figure 5. Adverse left ventricular (LV) remodeling in D6^{-/-} mice depends on chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2) signaling. **A**, LV end-systolic endocardial volume (μL), **B** LV end-systolic endocardial volume (μL), and **C** endocardial ejection fraction (%) in wild-type (WT) mice lethally irradiated and reconstituted with WT or D6^{-/-} bone marrow (BM) cells (n=9–10). **D**, LV end-systolic endocardial volume (μL), **E** LV end-systolic endocardial volume (μL), and **F** endocardial ejection fraction (%) in WT and D6^{-/-} mice lethally irradiated and reconstituted with WT or CCR2^{-/-} BM cells. * $P < 0.05$ (n=3–10).

heart, leading to the recruitment of pathogenic inflammatory Ly6Chi monocytes and neutrophils, and where D6 acts as a gatekeeper of uncontrolled inflammation through the regulation of CC-chemokine levels.

D6 is known to be expressed by lymphatic endothelial cells¹⁰ and some specific leukocyte population such as innate-like B cells¹⁶ and transforming growth factor- β -activated macrophages.¹⁷ Our data clearly suggest that D6 is preferentially expressed in the infarcted heart, as it was undetectable in viable human myocardium and its mRNA expression strongly raised after MI in mice. In our murine MI model, this increase in D6 levels could reflect expression by infiltrating leukocytes, increased expression in D6 expressing cells, or proliferation of D6 expressing cells after MI. The fact that high levels of D6 mRNA were maintained at 14 days after MI, when inflammation had almost completely faded (data not shown), suggests that this increase in D6 mRNA is at least partially leukocyte independent. In our immunohistochemical study on human MI biopsies, we surprisingly observed D6 expression on vascular endothelial cells (Figure 1), although these were previously described to be consistently D6 negative.¹⁸ Of note, these previous observations were mostly conducted on healthy tissues, and one could speculate that D6 expression could be induced in vascular endothelial cells in the hypoxic and highly pro-inflammatory environment of cardiac ischemic areas. In this line, transforming growth factor- β , which is predominantly expressed during MI healing,¹ is able to induce D6 expression in a globin transcription factor 1-dependent manner in leukocytes.¹⁷

Most interestingly, D6 controlled the level of the major inflammatory CC-chemokines CCL2 and CCL3. This might constitute a new mechanism by which the organism actively attempts to restrain post-MI inflammation and the associated tissue damage by diminishing CC-chemokine bioavailability. Indeed, various reports have shown that CCL2 or CCL3 were able to promote MI-associated inflammation.¹⁹ Most particularly, CCL2/CCR2 signaling is known to control Ly6Chi monocyte systemic levels after limb ischemia¹⁵ and controls the infiltration of this proinflammatory monocyte subset in the ischemic heart.² In this line, we observed a strong increase of Ly6Chi monocyte infiltration in D6^{-/-} MIs. Neutrophil levels were also increased, which was puzzling, as CC-chemokine are not classic granulocyte chemoattractants. Nevertheless, nuclear factor- κ B-dependent expression of CCR2 in neutrophils can be induced during inflammatory diseases such as sepsis.²⁰ CCL3, which levels were upregulated in D6^{-/-} hearts, has also been shown to attract neutrophils in a CCR1-dependent manner.²¹ Furthermore, increased neutrophil infiltration has been noted in D6^{-/-} mice in models of sterile skin inflammation¹⁰ and microbial lung inflammation.¹¹ Moreover, we observed increased neutrophil counts in the blood of D6^{-/-} mice at 5 and 7 days after MI (data not shown), further suggesting a clear effect of D6 deficiency on neutrophil systemic and local levels after MI. It is noteworthy that D6 deficiency led to a specific increase in the infiltration of potentially pathogenic neutrophils and Ly6Chi monocytes, although proangiogenic and more generally prohealing Ly6Clo monocytes levels were not affected. This might be

explained by the fact that Ly6Clo monocyte recruitment to the infarcted heart depends on chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 and its ligand, Fractalkine/chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, but not on CCR2.²

Previous reports have shown that neutrophils and Ly6Chi monocytes express proteases in the ischemic heart, which promote adverse remodeling and cardiac rupture.^{3,4} Nevertheless, leukocyte proteases are necessary for adequate myocardial angiogenesis after MI,³ and disruption of CCR2 signaling hampers angiogenesis in limb¹⁵ or myocardial² ischemia, emphasizing the need of an inflammatory balance for proper tissue remodeling. Here, D6 appears as an important regulator of this inflammatory balance, preventing Ly6Chi and neutrophil infiltration in the ischemic heart to reach pathogenic levels resulting in LV dilation and cardiac rupture.

Our observation of abundant D6 expression on leukocytes and CD68⁺ macrophages infiltrated in human MIs led us to hypothesize that chemokine scavenging in the ischemic heart might be mediated by inflammatory cell-borne D6. Nevertheless, our chimera studies in mice failed to evidence a role for leukocyte-borne D6. This is consistent with a previous study showing that despite strong D6 expression, leukocyte did not significantly participate to D6-mediated anti-inflammatory effects in a setting of gut inflammation.¹² Nonetheless, it should be noted that those experiments have been conducted in young and otherwise healthy WT animals in which D6 expression by other cell types, including lymphatic endothelial cells, might compensate the chemokine scavenging defect of infiltrating leukocytes. Cardiovascular risk factors such as hypercholesterolemia, which is known to induce lymphatic vessels dysfunction,²² might reduce chemokine scavenging by D6 expressing lymphatics and reveal a role for leukocyte-borne D6.

Besides its well-described role in monocyte chemoattraction, CCL2 has been suggested to promote fibrosis via direct action on fibroblasts,²³ and was also shown to induce cardiomyocyte apoptosis.^{24,25} Those 2 properties of CCL2 might participate to adverse LV remodeling after MI in D6^{-/-} mice. Nevertheless, we did not observe any evidence of significant fibrosis in D6^{-/-} hearts (data not shown), and deletion of CCR2 specifically on BM-derived leukocytes led to a total rescue of D6^{-/-} mice phenotype. Hence, it appears that D6 protective effects during post-MI LV remodeling preferentially depend on its anti-inflammatory properties.

In conclusion, we show in this work that D6-dependent CC-chemokine scavenging controls tissue homeostasis and cardiac remodeling after MI. Our study also provides a mechanism for the fine-tuning of the balance between protective and pathogenic immune responses, which could be a suitable target for innovative therapeutic approaches.

Sources of Funding

This work was supported by grants from INSERM, European community (ENDOSTEM No. 241440). C. Combadière is a recipient of a contract Interface from Assistance Publique-Hopitaux de Paris. Dr Silvestre is supported by grants from Fondation de la Recherche Médicale, Agence National pour la Recherche Chemrepair (2010 BLAN 1127 02) and fondation Leducq transatlantic network

(09-CVD-01). Dr Silvestre is a recipient of a Contrat d'Interface from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. K.Y.H.W. Yin is supported by Region île de France. A. Récalde is supported by Fondation pour la Recherche Médicale. M. Locati and R. Bonecchi are supported by Italian Association for Cancer Research, Regione Lombardia, and Fondazione Cariplo.

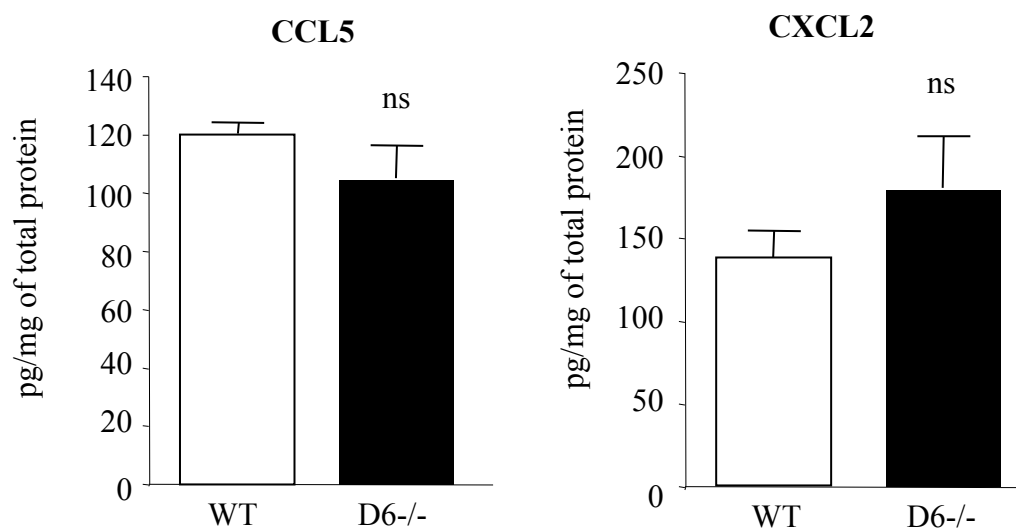
Disclosures

None.

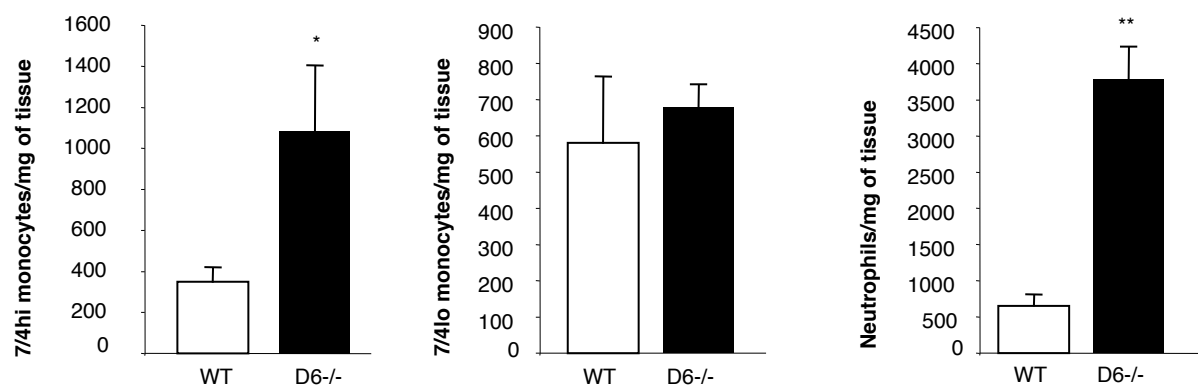
References

1. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1907–1939.
2. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037–3047.
3. Heymans S, Luttun A, Nuyens D, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*. 1999;5:1135–1142.
4. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, Nahrendorf M. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1629–1638.
5. Kaikita K, Hayasaki T, Okuma T, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol*. 2004;165:439–447.
6. Hayasaki T, Kaikita K, Okuma T, Yamamoto E, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. CC chemokine receptor-2 deficiency attenuates oxidative stress and infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in mice. *Circ J*. 2006;70:342–351.
7. Liehn EA, Piccinini AM, Koenen RR, Soehnlein O, Adage T, Fatu R, Curaj A, Popescu A, Zernecke A, Kungl AJ, Weber C. A new monocyte chemotactic protein-1/chemokine CC motif ligand-2 competitor limiting neointima formation and myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:1847–1857.
8. de Jager SC, Kraaijeveld AO, Grauss RW, de Jager W, Liem SS, van der Hoeven BL, Prakken BJ, Putter H, van Berkel TJ, Atsma DE, Schalij MJ, Jukema JW, Biessen EA. CCL3 (MIP-1 alpha) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognostic power for future ischemic events. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:446–452.
9. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:907–918.
10. Jamieson T, Cook DN, Nibbs RJ, Rot A, Nixon C, McLean P, Alcamí A, Lira SA, Wiekowski M, Graham GJ. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nat Immunol*. 2005;6:403–411.
11. Di Liberto D, Locati M, Caccamo N, Vecchi A, Meraviglia S, Salerno A, Sireci G, Nebuloni M, Caceres N, Cardona PJ, Dieli F, Mantovani A. Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 2008;205:2075–2084.
12. Vetrano S, Borroni EM, Sarukhan A, Savino B, Bonecchi R, Correale C, Arena V, Fantini M, Roncalli M, Malesci A, Mantovani A, Locati M, Danese S. The lymphatic system controls intestinal inflammation and inflammation-associated Colon Cancer through the chemokine decoy receptor D6. *Gut*. 2010;59:197–206.
13. Lee KM, McKimmie CS, Gilchrist DS, Pallas KJ, Nibbs RJ, Garside P, McDonald V, Jenkins C, Ransohoff R, Liu L, Milling S, Cerovic V, Graham GJ. D6 facilitates cellular migration and fluid flow to lymph nodes by suppressing lymphatic congestion. *Blood*. 2011;118:6220–6229.
14. Cazes A, Duong Van Huyen JP, Fornes P, Amrein C, Guillemain R, Grinda JM, Bruneval P. Mechanical ventricular assistance in heart failure: pathology of the cardiac apex removed during device implantation. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:112–116.
15. Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Récalde A, Richart AL, Loinard C, Zouggari Y, Guérin C, Duriez M, Combadière B, Poupel L, Lévy BI, Mallat Z, Combadière C, Silvestre JS. Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res*. 2010;88:186–195.
16. Hansell CA, Schiering C, Kinstrie R, Ford L, Bordon Y, McInnes IB, Goodyear CS, Nibbs RJ. Universal expression and dual function of the atypical chemokine receptor D6 on innate-like B cells in mice. *Blood*. 2011;117:5413–5424.
17. McKimmie CS, Fraser AR, Hansell C, et al. Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1. *J Immunol*. 2008;181:8171–8181.
18. Nibbs RJ, Kriebhuber E, Ponath PD, Parent D, Qin S, Campbell JD, Henderson A, Kerjaschki D, Maurer D, Graham GJ, Rot A. The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *Am J Pathol*. 2001;158:867–877.
19. Frangogiannis NG, Entman ML. Targeting the chemokines in myocardial inflammation. *Circulation*. 2004;110:1341–1342.
20. Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:234–242.
21. Bonecchi R, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Bernasconi S, Locati M, Power C, Proudfoot A, Wells TN, Mackay C, Mantovani A, Sozzani S. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. *J Immunol*. 1999;162:474–479.
22. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, Angeli V. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol*. 2009;175:1328–1337.
23. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem*. 1996;271:17779–17784.
24. Younce CW, Kolattukudy PE. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCP-1. *Biochem J*. 2010;426:43–53.
25. Younce CW, Wang K, Kolattukudy PE. Hyperglycaemia-induced cardiomyocyte death is mediated via MCP-1 production and induction of a novel zinc-finger protein MCP-1. *Cardiovasc Res*. 2010;87:665–674.

Supplement Material



Supplementary figure I. CCL5 and CXCL2 protein levels in WT and D6-/- hearts 5 days after infarction.

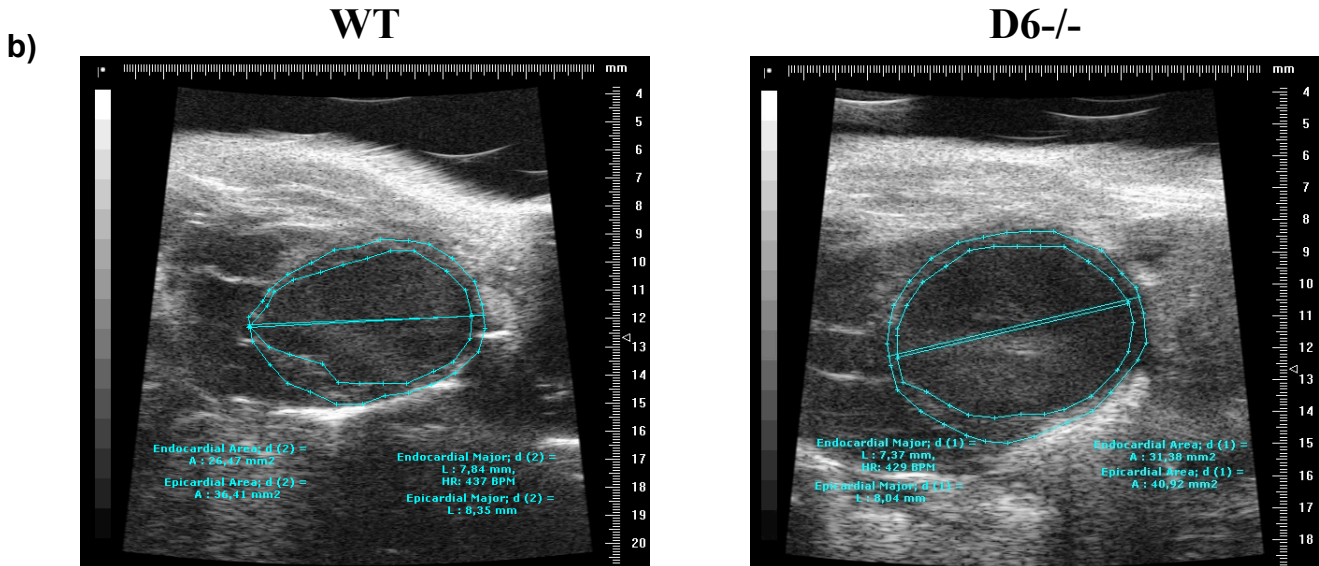


Supplementary figure II. Inflammatory cells infiltration in ischemic cardiac tissue at 7 days after infarction. Infiltration of 7/4hi monocytes, 7/4lo monocytes and neutrophils in WT and D6-/- infarcts 7 days after myocardial infarction. *p<0.05, **p<0.01 vs WT (n=3/group)

a)

	HR	IVSd (mm)	IVSs (mm)	LVPWd (mm)	LVPWs (mm)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	FS (%)
<i>WT</i>	475+/-26	8.58+/-0.48	12.17+/-0.96	7.83+/-0.44	10.75+/-0.21	38.9+/-2.0	24.4+/-0.9	37.7+/-0.3
<i>D6-/-</i>	426+/-21	8.31+/-0.48	12.00+/-0.69	7.11+/-0.21	9.87+/-0.53	47.2+/-1.9	27.9+/-1.6	35.8+/-1.6
<i>p value</i>	0.19	0.71	0.88	0.16	0.20	0.22	0.12	0.35

HR: Heart rate in bpm; IVS: Interventricular Septal Wall Thickness, d=diastolic, s=systolic; LVPW: Left Ventricle Posterior Wall thickness, d=diastolic, s=systolic; LVID: Left Ventricular Internal Diameter, d=diastolic, s=systolic; FS: Fractional Shortening.



c)

	Heart Rate (BPM)	Average Wall Thickness (mm)	Fractional Area Contraction (%)
<i>WT</i>	474.5+/-15.7	0.46+/-0.02	17.8+/-2.7
<i>D6-/-</i>	495.0+/-13.5	0.39+/-0.02	9.3+/-0.8
<i>p value</i>	0.36	0.053	0.069

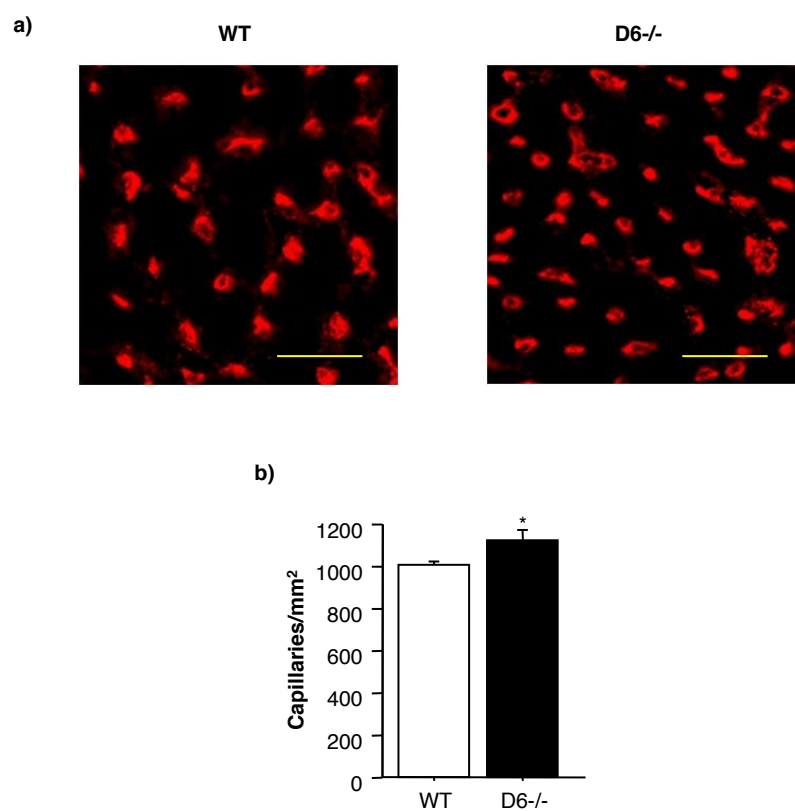
d)

Host	BM	Heart Rate (BPM)	Average Wall Thickness (mm)	Fractional Area Contraction (%)
<i>WT</i>	<i>WT</i>	458.3+/-32.1	0.41+/-0.02	16.82+/-2.7
<i>WT</i>	<i>D6-/-</i>	442.4+/-30.9	0.41+/-0.03	17.2+/-2.3
	<i>p value</i>	0.72	0.97	0.92

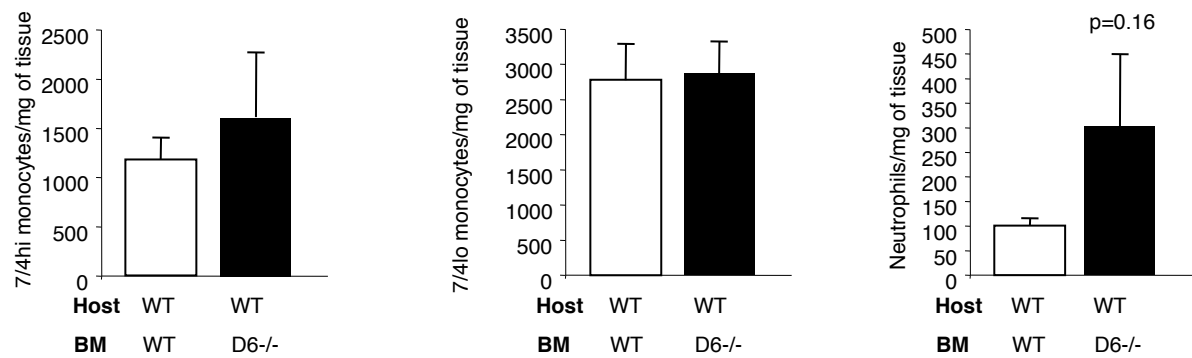
e)

Host	BM	Heart Rate (BPM)	Average Wall Thickness (mm)	Fractional Area Contraction (%)
<i>WT</i>	<i>WT</i>	479.5+/-15.1	0.53+/-0.01	16.4+/-1.9
<i>WT</i>	<i>CCR2-/-</i>	478.2+/-13.1	0.56+/-0.04	20.9+/-2.3
<i>D6-/-</i>	<i>WT</i>	480.0+/-22.45	0.44+/-0.02**	9.6+/-1.6*
<i>D6-/-</i>	<i>CCR2-/-</i>	483.6+/-11.6	0.55+/-0.05	18.0+/-0.7
	<i>p value</i>	ns	**p<0.01 vs WTBM:WThost	*p<0.05 vs WTBM:WThost

Supplementary figure III. a) Baseline cardiac function in D6-/- vs WT mice as assessed by M-mode echocardiography; b) Representative B-mode echocardiography images of a WT and a D6-/- heart in diastole, with delineation of endocardium and epicardium, at 14 days after MI. Additionally B-mode echocardiographic measurements 14 days after MI in c) WT vs D6-/- mice; d) WT BM>WT Host vs D6-/- BM>WT Host; e) WT BM>WT Host vs WT BM>D6-/- Host, CCR2-/- BM>D6-/- Host and CCR2-/- BM>WT Host.



Supplementary figure IV. Capillary density in the infarct border zone 14 days after infarction. a) representative photomicrographs and b) quantitative analysis of Caveolin1+ capillaries per mm² in the border zone of WT and D6^{-/-} infarcts, 14 days after MI. Scale bar 50 micrometers, *p<0.05 vs WT (n=6 to 8)



Supplementary figure V. Effect of leukocyte specific D6 deletion on MI inflammation. 7/4hi monocytes, 7/4lo monocytes and neutrophils infiltration in WT mice lethally irradiated and reconstituted with WT (WT BM) or D6-/- (D6-/- BM) bone marrow cells, 7 days after MI (n=5/group).